



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOÃO PAULO TREVIZAN BAÚ

**COMPORTAMENTO DE BIOMOLÉCULAS E SUAS
INTERAÇÕES COM MINERAIS EM DIFERENTES
CONDIÇÕES SIMULADAS DA TERRA PREBIÓTICA
EXPOSTOS À RADIAÇÃO GAMA UTILIZANDO DIVERSAS
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

JOÃO PAULO TREVIZAN BAÚ

**COMPORTAMENTO DE BIOMOLÉCULAS E SUAS
INTERAÇÕES COM MINERAIS EM DIFERENTES
CONDIÇÕES SIMULADAS DA TERRA PREBIÓTICA
EXPOSTOS À RADIAÇÃO GAMA UTILIZANDO DIVERSAS
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

Tese de doutorado apresentado ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Dimas A. M. Zaia

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Baú, João Paulo Trevizan.

Comportamento de biomoléculas e suas interações com minerais em diferentes condições simuladas da Terra Prebiótica expostos à radiação gama utilizando diversas técnicas espectroscópicas / João Paulo Trevizan Baú. - Londrina, 2019.
145 f. : il.

Orientador: Dimas Augusto Morozin Zaia.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Origem da vida - Tese. 2. Bases nitrogenadas - Tese. 3. Aminoácidos - Tese. 4. Radiação ionizante - Tese. I. Zaia, Dimas Augusto Morozin. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

JOÃO PAULO TREVIZAN BAÚ

**COMPORTAMENTO DE BIOMOLÉCULAS E SUAS INTERAÇÕES
COM MINERAIS EM DIFERENTES CONDIÇÕES SIMULADAS DA
TERRA PREBIÓTICA EXPOSTOS À RADIAÇÃO GAMA
UTILIZANDO DIVERSAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

Tese de doutorado apresentado ao Departamento de
Química da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Dimas Augusto Morozin
Zaia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antônia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Douglas C. Dragunski
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
UNIOESTE

Prof. Dr. Antonio Carlos S. da Costa
Universidade Estadual de Maringá –
UEM

Prof. Dra. María Colín Garcia
Universidad Nacional Autónoma de México –
UNAM

Londrina, 19 de março de 2019

À Angelita, por estar ao meu lado todo este tempo...

Aos meus pais, por todo auxílio e incentivo...

AGRADECIMENTOS

Esta tese é fruto de não só apenas 5 anos do curso de Doutorado em Química, mas de todo meu percurso acadêmico e estudantil. De modo que mesmo sendo o responsável pela tese, muitas pessoas contribuíram de alguma forma com estes trabalhos, compilados neste texto. Sou muito grato a todos.

Ao professor e orientador Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia, foram exatos 10 anos de parceria e companheirismo, desde minha iniciação científica até hoje. Sempre demonstrando incentivo e dedicação à área de pesquisa, que é tão intrigante e fascinante. A todos colegas que passaram grupo do LQP, Laboratório de Química Prebiótica, pela parceria no dia a dia durante todos estes anos. O aprendizado que por cada um proporcionado foi único. Aos professores, técnicos e funcionários do departamento de Química da UEL, pela formação acadêmica e científica.

A professora e orientadora Dra. María Colín Garcia, pela paciência e por me aceitar e guiar durante meu estágio na Cidade do México. Agradeço também a todos professores doutores, técnicos e colegas do Laboratório de Evolución Química da Universidade Nacional Autónoma do México – UNAM, pela recepção e por fazerem deste momento uma feliz lembrança.

A CAPES pela bolsa de doutorado e bolsa de doutorado sanduíche.

A toda minha família, que desde minha infância incentivaram e proporcionaram condições para que eu pudesse trilhar este caminho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente envolveram-se neste projeto.

A minha esposa Angelita Cristina Maquera, que esteve ao meu lado neste intenso período de pós-graduação. Sou grato por seu amor, paciência e força, em especial nos momentos de minha ausência. Você me ajudou chegar até aqui.

*“[...] the intimate relation of Life with laws of chemical combination,
& the universality of latter render spontaneous generation not improbable.”¹*

Charles Darwin, 1837

¹ Peretó, J., Bada, J. L., & Lazcano, A. (2009). Charles Darwin and the origin of life. *Origins of life and evolution of biospheres*, 39(5), 395-406.

BAÚ, João Paulo Trevizan. **Comportamento de biomoléculas e suas interações com minerais em diferentes condições simuladas da Terra Prebiótica expostos à radiação gama utilizando diversas técnicas espectroscópicas.** 145 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

RESUMO

Neste trabalho as interações de biomoléculas com sais e minerais em condições de química prebiótica foram investigadas. Verificou-se que os sólidos de uracila obtidos por liofilização de soluções em meio básico e em diferentes águas do mar artificiais, sofre mudanças estruturais. Estas modificações são devidas à desprotonação do nitrogênio N₃ em meio básico e a interação com os cátions presentes nas águas do mar com o grupo C₄=O, alterando sua reatividade por meio do nitrogênio N₁, energia do orbital HOMO e carga atômica. Adenina em solução é facilmente degradada devido à formação de radicais livres induzidos pela radiação ionizante. Quando em solução de água do mar, adenina possui menor taxa de degradação, devido aos íons presentes na água do mar que interagem com os radicais livres. Montmorillonita foi capaz de adsorver adenina e protege-la contra radiação gama, dando suporte a hipótese mineral. Verificou-se que os sais da água do mar estabilizam o sistema argila-adenina em suspensão. Experimentos foram realizados com os aminoácidos (Gly, Ala) e o mineral Goethita. Foram ensaiados três tratamentos térmicos simulando condições da Terra Primitiva. Por cromatografia líquida (HPLC) e espectrometria de massas (ESI-MS) observou-se a formação dos pequenos peptídeos. Para glicina e alanina, com goethita foram sintetizados peptídeos, entretanto, foi no tratamento seco/molhado onde se teve maior rendimento.

Palavras-chave: Origem da vida, bases nitrogenadas, aminoácidos e radiação ionizante.

BAÚ, João Paulo Trevizan. **Behavior of biomolecules and its interactions with minerals in different simulated Earth Prebiotic conditions exposed to gamma radiation using various spectroscopic techniques.** 145 f. Thesis (Doctoral degree thesis) – State University of Londrina, Londrina. 2019.

ABSTRACT

In this work, the interactions of biomolecules with salts and minerals under prebiotic chemistry conditions were investigated. It has been found that uracil solids obtained from lyophilization of solutions in basic medium and in different artificial seawaters undergoes structural changes. These modifications are due to the deprotonation of nitrogen N₃ in basic medium and the interaction with the cations present in the seawaters with the C4 = O group. This interaction with the cations of the seawater causes a change in the reactivity of the uracil through the N₁ nitrogen, energy of the HOMO orbital and atomic charge. Adenine in solution is easily degraded due to the formation of free radicals induced by ionizing radiation. When in seawater solution, adenine has a lower rate of degradation due to the ions present in seawater that interact with free radicals. Montmorillonite was able to adsorb adenine and protect it against gamma radiation, supporting the mineral hypothesis. Sea salt salts have been found to stabilize the suspended clay-adenine system. Experiments were performed with amino acids (Gly, Ala) and mineral goethite. Three thermal treatments were performed simulating conditions of the early Earth. High-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (ESI-MS) showed the formation of small peptides. For glycine and alanine, peptides were synthesized with goethite, however it was at the dehydrated / hydrated cycles where the highest yield was obtained.

Keywords: Origin of Life, nucleic acid bases, amino acids, ionizing radiation.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ga	Um bilhão de anos (Giga anos)
0,0 Ga	Água do mar atual
3,2-S Ga	Água do mar superficial de 3,2 bilhões de anos atrás
3,2-H Ga	Água do mar de hidrotermais de 3,2 bilhões de anos atrás
4,0 Ga	Água do mar de 4,0 bilhões de anos atrás
Ura	Uracila
Ura-I	Tautômero I da Uracila
Ura-II	Tautômero II da Uracila
DFT	Density Functional Theory
PCM	Polarization Continuos Model
Adn	Adenina
Ala	Alanina
C-ala	Ciclo alanina (alanina anidra)
A-ala	Dialanina
Gly	Glicina
C-gly	Ciclo glicina (glicina anidra)
G-gly	Diglicina
G-I	Goethita proveniente da síntese I
G-II	Goethita proveniente da síntese II
ACN	Acetonitrila (CH_3CN)

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Caracterização vibracional da estrutura da uracila em diferentes ambientes salinos. 11	11
2.1. Introdução	11
2.2. Objetivos	12
2.2.1. Objetivo geral	12
2.2.2. Objetivos específicos.....	13
2.3. Materiais e Métodos.....	13
2.3.1. Bases nitrogenadas	13
2.3.2. Soluções de água do mar	13
2.3.3. Preparo das soluções	13
2.3.4. Espectroscopia Raman	14
2.3.5. Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)	14
2.3.6. Cálculos Teóricos.....	14
2.4. Resultados	14
2.4.1. Espectroscopia Raman	15
2.4.2. Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)	18
2.4.3. Espectro Raman das soluções de uracila.....	21
2.4.4. Atribuição da molécula de Uracila.....	23
2.4.5. Espectro UV/Vis das soluções de uracila.....	25
2.4.6. Interação da uracila com os sais da água do mar	26
2.4.7. Cálculos Computacionais.....	29
2.5. Discussão	32
2.5.1. Reatividade da uracila para a formação de nucleosídeos.....	32
2.6. Conclusões	34
3. Radiólise de adenina em meio salino	36
3.1. Introdução	36
3.2. Objetivos	38
3.2.1. Objetivo Geral	38
3.2.2. Objetivos Específicos.....	38
3.3. Materiais e Métodos.....	38
3.3.1. Vidrarias	38
3.3.2. Água do mar artificial 4,0 Ga.....	38
3.3.3. Preparo das amostras.....	39
3.3.4. Ensaios de irradiação.....	39
3.3.5. Espectrofotometria UV-Vis.....	39
3.3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	39
3.3.7. Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)	39

3.3.8. Espectroscopia Raman	40
3.3.9. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	40
3.3.10. Análise Estatística	40
3.3.11. Cálculos Computacionais	40
3.4. Resultados	40
3.4.1. Adenina sólida exposta à radiação gama.....	40
3.4.2. Adenina aquosa exposta à radiação gama	44
3.4.3. Rendimento radioquímico	47
3.4.4. Análise Vibracional.....	48
3.4.5. Caracterização dos produtos de decomposição	52
3.4.6. Cálculos Teóricos	59
3.5. Discussão	62
3.5.1. Radicais derivados de adenina	62
3.5.2. Relevância da Água do Mar Prebiótica.....	64
3.6. Conclusões	65
4. Estabilidade de adenina adsorvida sob montmorillonita KSF exposta a radiação ionizante.....	67
4.1. Introdução	67
4.2. Objetivos	69
4.2.1. Objetivo Geral	69
4.2.2. Objetivos Específicos.....	69
4.3. Materiais e Métodos.....	69
4.3.1. Adenina e Montmorillonita	69
4.3.2. Vidrarias	69
4.3.3. Água do mar artificial 4,0 Ga.....	69
4.3.4. Experimentos de irradiação	69
4.3.5. Espectrofotometria UV-Vis.....	70
4.3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	71
4.3.7. Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)	71
4.3.8. Difractometria de Raios X (DRX)	71
4.3.9. Análise Estatística	71
4.4. Resultados	71
4.4.1. Ensaio Quantitativo	71
4.4.2. Ensaio Qualitativo	73
4.5. Discussão	80
4.5.1. Adsorção e proteção da adenina sob superfície mineral	80
4.5.2. Implicações para a Química Prebiótica.....	83
4.6. Conclusões	84
5. Formação térmica de peptídeos sob superfície de Goethita	86
5.1. Introdução	86

5.2. Objetivos	88
5.2.1. Objetivo Geral	88
5.2.2. Objetivos Específicos	88
5.3. Materiais e Métodos.....	88
5.3.1. Biomoléculas	88
5.3.2. Mineral Goethita	88
5.3.3. Tratamentos Térmicos.....	89
5.3.4. Extração dos aminoácidos	89
5.3.5. Experimento de Cinética	89
5.4. Instrumentação	90
5.4.1. Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)	90
5.4.2. Difractometria de Raios X (DRX)	90
5.4.3. Análise térmica (TG/DTG)	90
5.4.4. Análise Cromatográfica (HPLC).....	91
5.4.5. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	91
5.4.6. Análise textural (BET)	91
5.4.7. Espectrometria de massas (ESI-MS).....	92
5.5. Resultados	92
5.5.1. Caracterização das Goethitas	92
5.5.2. Aminoácidos e Peptídeos	96
5.5.3. Amostras controle	99
5.5.4. Ensaios de formação de peptídeos	103
5.5.5. Ensaios cinéticos	113
5.6. Discussão	114
5.6.1. Implicações para a Evolução Química.....	114
5.6.2. Revisitando a Hipótese de Bernal – Minerais como Fábricas Prebióticas	116
5.7. Conclusão.....	117
6. Considerações Finais	118
7. Referências Bibliográficas	120
Anexos.....	136
Anexo I	136
Anexo II	137
Anexo III.....	138

1. Introdução

A Química Prebiótica tem como objeto de estudo a origem da vida no planeta Terra. No início do século XX, dois cientistas, Oparin (1924) e Haldane (1929), propuseram que a origem da vida ocorreu através da chamada evolução química, onde moléculas menores reagiriam entre si de modo a formarem moléculas maiores e mais complexas. Com o acúmulo destas moléculas, elas poderiam interagir formando biopolímeros (peptídeos, polissacarídeos e nucleotídeos), em que por sua vez, estes formariam estruturas coacervadas, as quais são estruturas morfológicamente similares à célula. Com o tempo, havendo aumento das massas moleculares e obtendo-se atividade bioquímica seriam considerados sistemas vivos (Zaia, 2008).

Os experimentos de química prebiótica são constituídos por ensaios químicos que necessitam reproduzir os ambientes e condições da Terra primitiva. Condições estas como por exemplo, fontes de energia (calor e radiação ionizante), minerais presentes (argilas, zeólitas, óxidos) meio reacional (solução aquosa, água do mar, ambientes secos, mistura de gases). Dessa forma, este campo do conhecimento busca entender como tais fatores contribuíram para o surgimento do primeiro ser vivo.

Uma das principais hipóteses na química prebiótica é a hipótese de John Desmond Bernal (1949, 1951), conhecida também como a hipótese mineral. Bernal afirma que minerais tiveram um importante papel no surgimento dos seres vivos. Uma vez que minerais são abundantes e presentes na crosta terrestre.

Bernal sugeriu que minerais teriam o papel de proteger as biomoléculas contra radiação ionizante proveniente do sol, da hidrólise da água (reações de decomposição), e também de concentrar estas moléculas orgânicas por meio de processos de superfície (sorção). Muito se foi desenvolvido nesta linha, utilizando variados aminoácidos e bases nitrogenadas em diversos tipos de minerais (Hashizume e Theng, 1999; Benetoli et al, 2008; Carneiro, 2011; Baú et al, 2012). Além do efeito de proteção, os minerais concentrariam as biomoléculas de modo a formar polímeros, ou seja, promoção de reações químicas para se obter moléculas com maior massa molecular (Lahav e Chang, 1976; Lambert, 2008).

Mais recentemente, Zaia (2012) propõe que em experimentos de química prebiótica devam ser utilizadas soluções análogas à água do mar. Tornando-se um ponto chave investigado nesta presente tese. Nos mais variados experimentos publicados na área, poucos se utilizam de soluções salinas para representar um ambiente primitivo. A maior parte dos ensaios são

realizados em água destilada ou solução de cloreto de sódio (NaCl). Obviamente, com a adição de novos sais aos experimentos de química prebiótica aumentam-se as variáveis que devem ser levadas em conta na interpretação dos dados. Contudo, se faz importante aproximar-se das condições da Terra Primitiva. Anizelli *et al.*, (2014) demonstraram que as bases nitrogenadas adenina e timina são capazes de alterar sua reatividade e energia livre quando interagem com íons presentes em solução. Zaia (2012) sugere o uso de quatro (4) soluções salinas análogas às águas do mar (Tabela 1). A primeira é uma solução com a média das concentrações dos principais cátions e ânions presentes nas águas dos oceanos atualmente, denominada por água do mar 0,0 Ga (Brown *et al.*, 2004). A segunda água do mar, 4,0 Ga, representa um ambiente primitivo e é baseada nas concentrações de íons encontradas em um meteorito datado de 4,0 bilhões de anos (Izawa *et al.*, 2002). As outras águas do mar, 3,2-S Ga e 3,2-H Ga, representam ambientes salinos de fontes superficiais e hidrotermais, respectivamente, de 3,2 bilhões de anos atrás (de Ronde *et al.*, 1997). Um ponto importante a ser ressaltado é que a água do atual possui uma alta concentração dos íons sódio (Na⁺) e cloreto (Cl⁻), por outro lado, a água do mar 4,0 Ga possui maiores concentrações dos íons magnésio (Mg²⁺) e sulfato (SO₄²⁻). Diferentes espécies iônicas podem gerar diferentes interações, sendo assim, necessário investigar diferentes meios reacionais.

Tabela 1. Composição das soluções análogas à água do mar.

Água do mar	Composição*	pH	Referência
0,0 Ga	NaCl (28,57 g), MgCl ₂ 6H ₂ O (3,88 g), KBr (0,103 g), CaSO ₄ (1,308 g), K ₂ SO ₄ (0,832 g), H ₃ BO ₃ (0,028 g), MgSO ₄ (1,787 g)	≈ 8,0	Brown et al., 2004)
4,0 Ga	Na ₂ SO ₄ (0,271 g), MgCl ₂ ,6H ₂ O (0,500 g), CaCl ₂ 2H ₂ O (2,50 g), KBr (0,050 g), K ₂ SO ₄ (0,400 g), MgSO ₄ (15,00 g)	≈ 6,0	Izawa et al., 2002
3,2-S Ga	CaCl ₂ 2H ₂ O (34,12 g), MgCl ₂ , 6H ₂ O (10,35 g), KBr (0,268 g), NaCl (19,90 g), KI (0,006 g), NH ₄ Cl (0,273 g), SrCl ₂ 6H ₂ O (1,205 g), Na ₂ SO ₄ (0,333 g)	≈ 6,5	de Ronde et al., 1997
3,2-H Ga	NaCl (37,05 g), KBr (0,310 g), KI (0,010 g), NH ₄ Cl (0,610 g), SrCl ₂ 6H ₂ O (0,040 g), CaCl ₂ 2H ₂ O (6,26 g), KOH (1,07 g), NaOH (0,200 g),	≈ 12,0	de Ronde et al., 1997

* Composição para 1 litro (1L) de solução. Os sais devem ser adicionados conforme ordem apresentada, e cada sal posterior a total dissolução do sal anterior. De modo a facilitar o preparo, pode ser utilizado o banho de ultrassom.

Esta tese está organizada como uma compilação de artigos e experimentos realizados durante o período do curso de Doutorado. Todos os capítulos estão inseridos no contexto da química prebiótica e buscam compreender o comportamento de algumas biomoléculas importantes aos seres vivos, em diferentes condições que remetem à Terra Primitiva. Portanto, esta tese tem como objetivo a caracterização das interações de biomoléculas (Figura 1) com sais da água do mar (Tabela 1) e com minerais (Figura 2). Todos os experimentos simulam ambientes e/ou condições da Terra primitiva, com intuito de compreender quais variáveis contribuem para a reatividade, degradação e/ou proteção destas moléculas orgânicas, no contexto da evolução química.

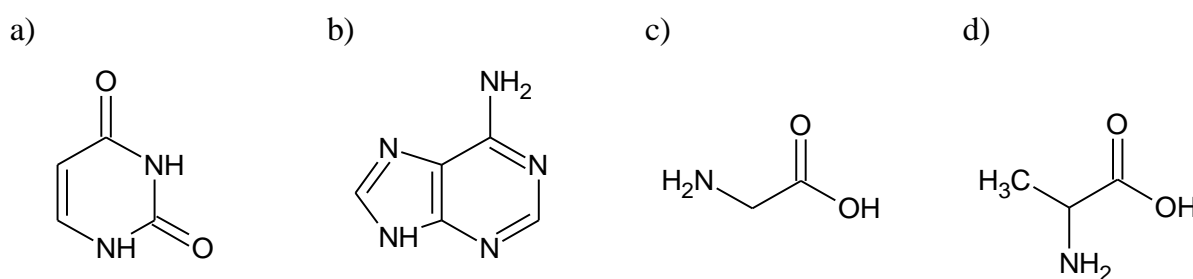


Figura 1. Representação bidimensional das estruturas moleculares de: **a)** Uracila (Ura); **b)** Adenina (Adn); **c)** Glicina (Gly); **d)** Alanina (Ala).

No segundo capítulo é descrito o processo de caracterização dos sólidos obtidos da liofilização da base nitrogenada uracila em diferentes soluções de água do mar artificiais e em água ultra pura. Realizaram-se cálculos computacionais utilizando a teoria de densidade funcional (DFT) de modo a compreender os resultados experimentais, correlacionando-os com os resultados teóricos.

O terceiro e quarto capítulos apresentam experimentos utilizando a base nitrogenada adenina exposta à radiação ionizante. Realizaram-se estes experimentos no *Laboratório de Evolución Química* da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM), sob a supervisão da Dra. Maria Collín-García. Os experimentos foram submetidos em um reator com Co^{60} , emissor da radiação gama, em que degradação e proteção por argila foram avaliados. As doses de irradiação são apresentadas em termos de tempo (h), unidade de radiação (kGy) e posição utilizada no reator, instalado no Instituto de Ciências Nucleares (UNAM) (Tabela 2).

No quinto capítulo é apresentado o experimento utilizando os aminoácidos glicina e alanina. Neste, é testada a hipótese de catálise mineral na formação de peptídeos em superfície de óxido de ferro, goethita. Três tratamentos térmicos a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram realizados, em condições

secas, molhadas e ciclos seco/molhado. Uma vez que para a formação da ligação peptídica se requer a remoção de água, várias condições foram testadas. Ao final, no capítulo seis, são apresentadas as considerações finais acerca desta presente tese.

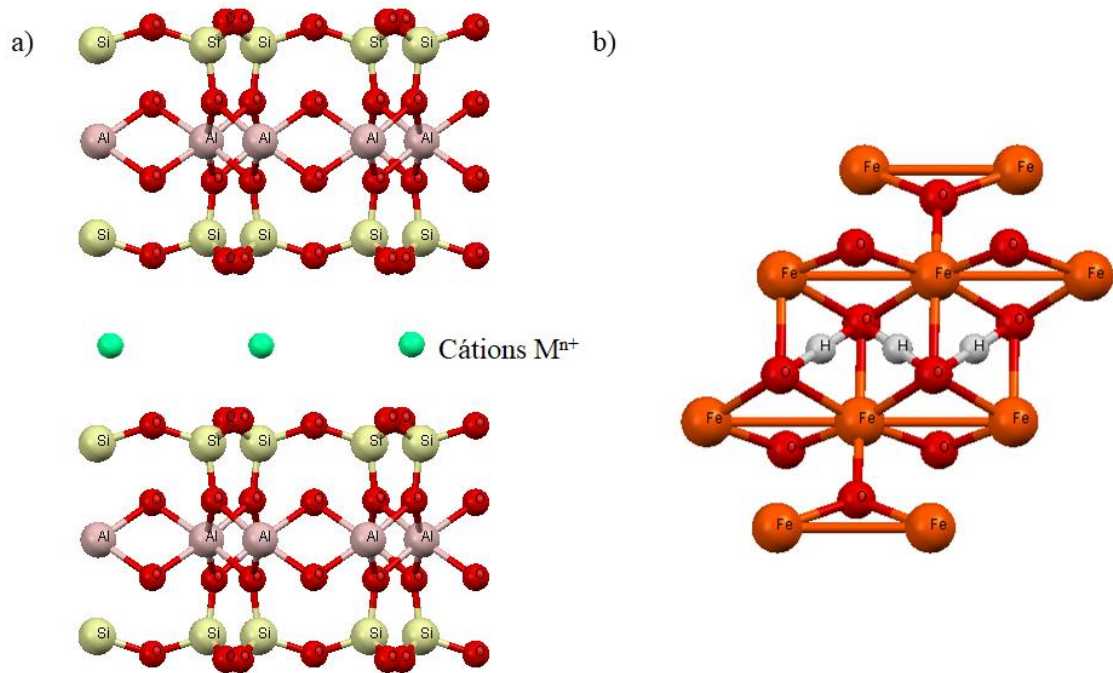


Figura 2. Representação das estruturas cristalográficas dos minerais: **a)** Montmorillonita (argila, aluminossilicato 2:1), cátion M (metal) com carga $n+$; **b)** Goethita (óxido hidróxido de ferro).

Tabela 2. Tempo e dose de exposição das amostras à irradiação ionizante de Co^{60} .

Posição (Irradiador)	Taxa de dose (Gy min^{-1})	Tempo (h)	Dose (kGy)
14	197,58	2,0	23,71
11	196,93	4,0	47,26
14	197,58	6,0	71,12
11	196,93	8,0	94,52

2. Caracterização vibracional da estrutura da uracila em diferentes ambientes salinos

Sólidos de uracila obtidos a partir da liofilização de diferentes soluções foram caracterizados utilizando espectroscopia no infravermelho e Raman. As frequências observadas foram comparadas com as obtidas por cálculos teóricos. Investigou-se o efeito da variação de pH e presença de cátions da água do mar. Uracila sofre desprotonação em solução com valor de pH acima do valor de pK_{a2} , que resultam em mudanças nos espectros Raman e FT-IR. Uracila interage com os cátions pelo grupo carbonila ($C_4=O$), que por consequência diminuem os valores de energia relativa da molécula e energia do orbital HOMO.

2.1. Introdução

A caracterização dos modos vibracionais de uma molécula pode auxiliar a entender como a estrutura dessa molécula se estabelece em diferentes ambientes químicos. O estudo da molécula de adenina e timina em diferentes ambientes salinos revelou que podem existir diferentes interações dessas bases nitrogenadas com os sais presentes na água do mar (Anizelli et al, 2014). Cátions bivalentes como Mg^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+} podem apresentar uma maior interação com uma posição bidentada com a adenina. Portanto, para a química prebiótica, faz-se necessário o estudo das outras bases nitrogenadas, como por exemplo, a uracila, para o melhor entendimento das estruturas dessas biomoléculas nesses ambientes químicos. Alguns artigos reportam investigações espectroscópicas e cálculos teóricos para a uracila (Singh *et al.*, 2013; Barnes *et al.*, 1984).

Quatro diferentes tipos de água do mar artificiais foram utilizados neste estudo, conforme sugerido por Zaia (2012). A composição de água do mar 0,0 Ga é baseada na média das concentrações dos sais dos oceanos atuais. As composições da água do mar superficial de 3,2 Ga e água do mar de ambientes hidrotermais de 3,2 Ga foram baseadas em um fluido hidrotermal constituído de dois componentes, parte hidrotermal e parte água do mar superficial. A composição da água do mar artificial de 4,0 Ga estruturou-se nos íons extraídos de um meteorito condrito carbonáceo encontrado no Lago Tagish e que possui a idade de 4,0 Ga (Izawa *et al.*, 2010). Altas concentrações de $MgSO_4$ e $MgCl_2$ foram encontradas na superfície de Marte (Wänke *et al.*, 2001). Isto sugere que é possível que íons como SO_4^{2-} , Mg^{2+} e Ca^{2+} estivessem presentes nos oceanos primitivos em maiores concentrações que K^+ , Na^+ e Cl^- . Os

cátions bivalentes participariam na síntese de biopolímeros, como nucleosídeos e peptídeos (Monnard *et al.*, 2002). O cátion magnésio (Mg^{2+}) é importante para o metabolismo das células, ajudando na estabilização de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, e membranas de células) por interação com essas biomoléculas (Yang *et al.*, 2004).

O DNA e RNA são compostos de cinco bases nitrogenadas, adenina, timina, uracila, guanina e citosina. Estas bases nitrogenadas foram sintetizadas em experimentos que simulam condições da Terra Primitiva (fontes endógenas), e também são encontradas em meteoritos (fontes exógenas) (Ferris e Hagan Jr., 1984; Kobayashi *et al.*, 1986; Saladino *et al.*, 2001; LaRowe e Regnier, 2008; Martins *et al.*, 2008). Uma vez que ambas bases nitrogenadas (uracila) e cátions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+) estavam presentes na Terra Prebiótica, interações entre estes são um importante tópico em relação à Química Prebiótica.

Neste capítulo é reportado os espectros no infravermelho (FT-IR) e Raman, e cálculos teóricos para uracila, e a interações desta base nitrogenada com cátions presentes nos modelos de água do mar (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+}). As amostras foram investigadas na forma de solução de uracila em água destilada, com variação do valor de pH e em diferentes tipos de água do mar (cap. 1 Tabela 1). Sólidos foram obtidos da liofilização destas soluções e os espectros no infravermelho (FT-IR) e Raman adquiridos. As soluções em meios ácidos e alcalinos são cenários plausíveis para ambientes prebióticos, uma vez que ambientes hidrotermais abrangem uma grande faixa de pH (Holm *et al.*, 2006). Os sólidos obtidos a partir da liofilização de soluções em água do mar artificial representam um ambiente salino e seco. Deve ser pontuado que os cátions metálicos presentes nas águas do mar desempenham um papel importante nos seres vivos. Portanto, o objetivo deste capítulo é de investigar e entender as principais interações dos sais das diferentes águas do mar com a molécula de uracila, e de fornecer uma base experimental para futuras investigações em Química Prebiótica.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral

Investigar as interações da molécula uracila com os cátions presentes nos sais dos diferentes modelos de água do mar, simulando condições da Terra Primitiva.

2.2.2. Objetivos específicos

Estudar o efeito da variação de valor de pH na estrutura da uracila utilizando as espectroscopias no infravermelho (FT-IR) e Raman.

Investigar a interação da uracila com os cátions presentes nos sais das águas do mar artificiais utilizando as espectroscopias no infravermelho (FT-IR) e Raman.

Correlacionar os dados obtidos de efeito de variação de pH e interação de sais da água do mar sobre uracila com possíveis reações químicas e sua relevância para a química prebiótica.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Bases nitrogenadas

Composto uracila, de Sigma-Aldrich® (EUA).

2.3.2. Soluções de água do mar

Prepararam-se quatro tipos de água do mar artificiais (Zaia, 2012), uma representando a composição atual: **a)** 0,0 Ga (28,57 g NaCl, 3,88 g MgCl₂, 1,787 g MgSO₄, 1,308 g CaSO₄, 0,832 g K₂SO₄, 0,103 g KBr, 0,0282 g H₃BO₃); **b)** 4,0 Ga representando a composição da Terra primitiva (15,00 g MgSO₄, 2,50 g CaCl₂, 0,500 g MgCl₂, 0,400 g K₂SO₄, 0,271 g Na₂SO₄, 0,050 g KBr, 0,028 g H₃BO₃); **c)** 3,2-S Ga para a composição de 3,2 bilhões de anos atrás para água do mar (34,12 g CaCl₂.2H₂O, 19,90 g NaCl, 10,35 g MgCl₂.2H₂O, 1,205 g SrCl₂.6H₂O, 0,333 g Na₂SO₄, 0,273 g NH₄Cl, 0,268 g KBr, 0,006 g KI); e **d)** 3,2-H Ga para a composição da água do mar de 3,2 bilhões de anos atrás em hidrotermais (37,05 g NaCl, 6,26 g CaCl₂.2H₂O, 1,07 g KOH, 0,610 g NH₄Cl, 0,310 g KBr, 0,200 g NaOH, 0,040 g SrCl₂.6H₂O, 0,010 g KI). As quantidades de sais adicionados são equivalentes a um litro de solução (1 L).

2.3.3. Preparo das soluções

Foram preparadas duas concentrações diferentes de uracila. A primeira, com concentração de 1000 µg mL⁻¹ utilizando água ultra pura (Milli-Q). Com essa solução o valor de pH foi ajustado, utilizando soluções de ácido clorídrico (HCl, 0,1 mol L⁻¹) ou de hidróxido de sódio (NaOH, 0,1 mol L⁻¹), para: **a)** solução ácida (pH 2,00); **b)** solução básica (pH 12,0); e **c)** sem ajuste do valor de pH. O pK_{a2} da uracila tem o valor de 9,5 (Christensen *et al.*, 1967), para a solução alcalina foi escolhido um valor de pH superior ao valor de pK_a de modo a garantir que a estrutura anterior ao pK_{a2} esteja em menor quantidade. As soluções foram

congeladas, liofilizadas e os sólidos obtidos foram analisados por espectroscopias Raman e no infravermelho (FT-IR). Para a segunda concentração, a uracila foi dissolvida em 50 mL das soluções de águas do mar artificiais com concentração de $720 \mu\text{g mL}^{-1}$. Foi utilizada uma concentração menor porque a uracila não é solubilizada a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em solução salina. As soluções artificiais de água do mar foram preparadas utilizando água ultra pura (MilliQ). As soluções foram congeladas, liofilizadas e os sólidos submetidos às análises espectroscópicas (Raman e FT-IR).

2.3.4. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos a partir de amostras sólidas com um espectrógrafo micro-Raman DeltaNu e modelo avançado com uma linha de laser de 532 nm e 4 cm^{-1} de resolução.

2.3.5. Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Espectros FT-IR das amostras de 400 a 4000 cm^{-1} foram obtidos utilizando um espectrofotômetro FT-IR da Bruker modelo Vertex 70, com acessório de refletância Platinum ATR. A resolução de 4 cm^{-1} e 10 varreduras foram utilizados para obtenção do espectro.

2.3.6. Cálculos Teóricos

As otimizações de geometrias, cálculos de frequência e energia livre foram realizadas utilizando a teoria de densidade funcional DFT (*Density Functional Theory*) empregando o funcional híbrido B3LYP (Becke, 1988, Lee *et al.*, 1988, Becke, 1993), os conjuntos de bases aug-cc-pVDZ (Dunning, 1989) para melhor descrição dos átomos de oxigênio e nitrogênio, e 3-21G (Dobbs *et al.*, 1987) para os cálculos com os metais (Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} e Sr^{+2}), por meio do *software Gaussian03* (Frisch *et al.*, 2004). A otimização da geometria envolve a localização de um ponto mínimo de energia para a molécula em uma superfície de energia potencial. A ausência de frequências negativas nas otimizações de geometria das bases nitrogenadas é alcançada, o que caracteriza o mínimo de energia para as moléculas estudadas. De modo a considerar o efeito do solvente foi utilizado o método PCM (*Polarization Continuos Model*) com a constante dielétrica da água (Tomasi *et al.*, 1999).

2.4. Resultados

Obtiveram-se os sólidos de uracila a partir da liofilização de soluções com diferentes valores de pH, sem ajuste (em torno de 6~7), em meios ácido e alcalino. O sólido obtido a partir

de uma solução alcalino com valor de pH ajustado para 12,0 foi escolhido pois, representa um ambiente alcalino, o qual existia na Terra Primitiva, e porque é um valor de pH acima do valor do pK_{a2} da uracila (9,5) (Figura 1). Desse modo, é esperado encontrar uma estrutura diferente na molécula, devido a desprotonação da mesma. O segundo valor de pH, de 2,00, foi escolhido pois representa um ambiente ácido na Terra Primitiva. Este valor não está abaixo do pK_{a1} da uracila, que é de aproximadamente 0,5.

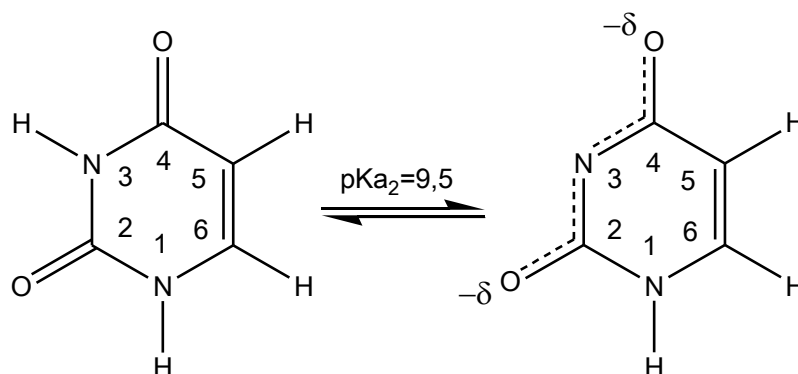


Figura 1. Estrutura molecular da Uracila.

Dessa forma, é esperado que não haja mudança estrutural na molécula, para este caso. Também foi preparado um sólido a partir da solução com valor de pH 0,3, ou seja, valor abaixo do pK_{a1} . As bandas nos obtidas nos espectros foram comparadas com artigos da literatura e a atribuição por tentativa das principais bandas foi realizada.

2.4.1. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman dos sólidos obtidos a partir das soluções sem tratamento, com o valor de pH ajustado para 0,3 e 2,00 são similares (Figura 2-b). Indicando que não ocorreu mudança estrutural na molécula de uracila. Com relação ao espectro da amostra obtida a partir da liofilização da solução de uracila, sem ajuste de pH, as bandas em 1644 e 1714 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{C}_5=\text{C}_6)$ e $\nu(\text{C}_4=\text{O})$, respectivamente (Tabela 1). De modo a explorar esta região do espectro, realizou-se a deconvolução das bandas para a região entre 1580 e 1700 cm^{-1} e foram encontradas três (3) bandas, em 1609, 1640 e 1663 cm^{-1} (Figura 3). A banda em 1663 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}_5=\text{C}_6)$ (Sing, 2013).

O espectro Raman do sólido obtido da liofilização da solução de uracila apresenta bandas em 1505 cm^{-1} atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ e *bending* no plano $\beta(\text{N}_1\text{-H})$, a banda em 1453 cm^{-1} é atribuída ao *bending* no plano $\beta(\text{N}_3\text{-H})$. A banda em 1418 cm^{-1} é atribuída ao estiramento

do anel (Singh, 2003). E as bandas em 1393 e 1236 cm^{-1} atribuídas às deformações $\beta(\text{C}_6\text{-H})$ e $\beta(\text{C}_5\text{-H})$, respectivamente. As bandas em 1100, 986 e 790 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento $\nu(\text{anel})$, *angle bending* $\alpha(\text{anel})$ (Singh, 2015) e deformação do anel $\delta(\text{anel})$, respectivamente (Tabela 1).

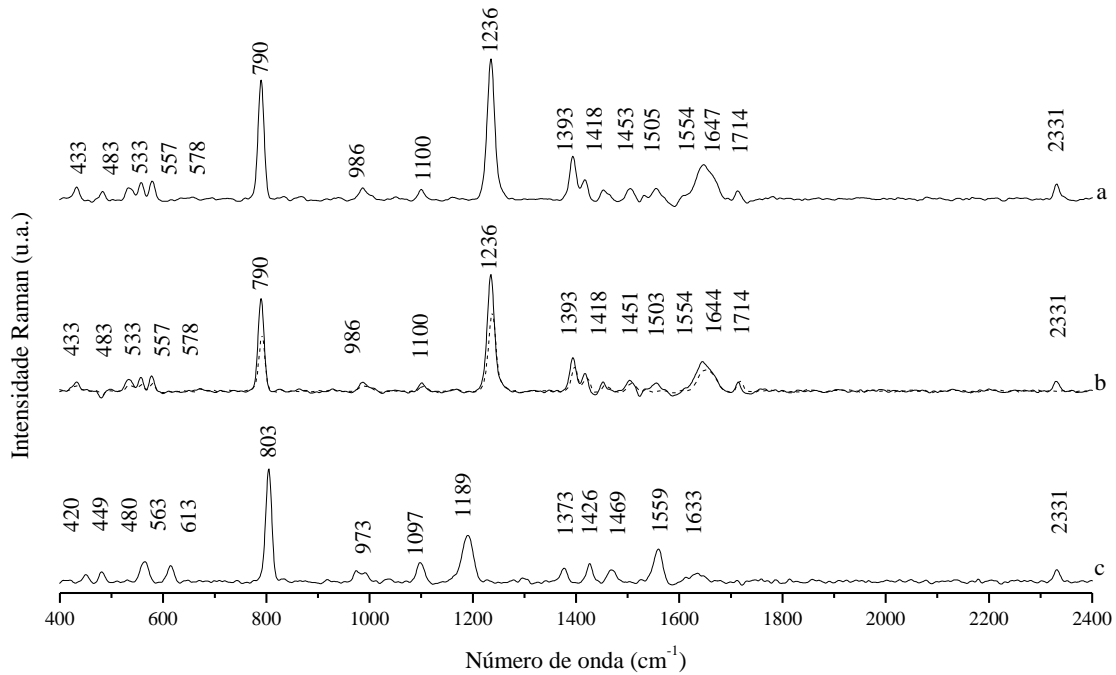


Figura 2. Espectros Raman: **a)** uracila liofilizada de água ultra pura, **b)** uracila liofilizada de solução com pH 0,3 (pontos) e 2,00 (linha); **c)** uracila liofilizada de solução com pH 12,0.

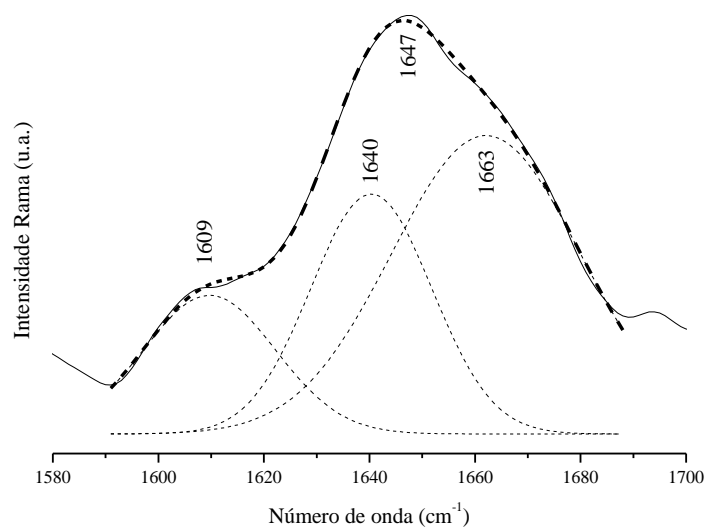


Figura 3. Espectros Raman da uracila liofilizada na região de 1580 a 1700 cm^{-1} . A melhor regressão foi obtida com três bandas ($R^2=0,998$)

As bandas em 1393 cm^{-1} e 1236 cm^{-1} são atribuídas ao *bending* $\beta(\text{C}_6\text{-H})$ e *bending* no plano $\beta(\text{C}_5\text{-H})$, respectivamente. Na região abaixo de 1200 cm^{-1} apenas três bandas são observadas em 1100 cm^{-1} , 986 cm^{-1} e 790 cm^{-1} . Estas são atribuídas às vibrações no anel, estiramento $\nu(\text{anel})$, *bending* angular $\alpha(\text{anel})$ e deformação $\delta(\text{ring})$ (Tabela 1).

O sólido obtido da liofilização da solução alcalina apresentou mudanças no espectro Raman (Figura 2-c). Essas mudanças são devido a alterações na estrutura da uracila, uma vez que o valor de pH é superior ao o valor do $\text{pK}_{\text{a}2}$ da uracila (Figura 1). O espectro Raman do sólido obtido a partir da solução básica apresentou deslocamento de 790 para 803 cm^{-1} atribuída à deformação do anel. Surgimentos de novas bandas em 1189 cm^{-1} atribuída ao estiramento $\nu(\text{anel})$ e 1373 cm^{-1} atribuída aos estiramentos $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ e $\nu(\text{N}_3\text{-H})$ ou $\nu(\text{N}_1\text{-H})$. Para o espectro FT-IR, a frequência em 1189 cm^{-1} também aparece para uracila alcalina, deve ser pontuado que Giese and McNaughton (2002) atribuem esta frequência aos estiramentos $\nu(\text{N}_1\text{C}_2\text{-C}_2\text{N}_3 + \text{N}_3\text{C}_4\text{-C}_4\text{C}_5)$ e *bending* $\beta(\text{C}_6\text{-H})$, o qual são vibrações no anel da uracila. No entanto, essas bandas não diferenciam as estruturas tautoméricas (Ura-I ou Ura-II) do ânion mesomérico, pois, Ura-I possui a ligação $\text{N}_3\text{-H}$ e Ura-II a ligação $\text{N}_1\text{-H}$ (Figura 4). O aparecimento da banda em 1633 cm^{-1} , atribuída aos estiramentos $\nu(\text{C}_2\text{-O})$ e $\nu(\text{C}_4\text{-O})$ (Figura 2-c) (Giese e McNaughton, 2002) reflete um caráter de ligação simples entre os átomos de carbono (C) e hidrogênio (H), resultado da desprotonação da molécula. Gould *et al.*, (1992), Lés e Adamowicz (1992), Giese e McNaughton, (2002) e Ortiz *et al.*, (2014) atribuem às frequências próximas a 1469 cm^{-1} ao estiramento $\nu(\text{N}_1\text{-H})$, o que indicaria a formação de Ura-II (Figura 4).

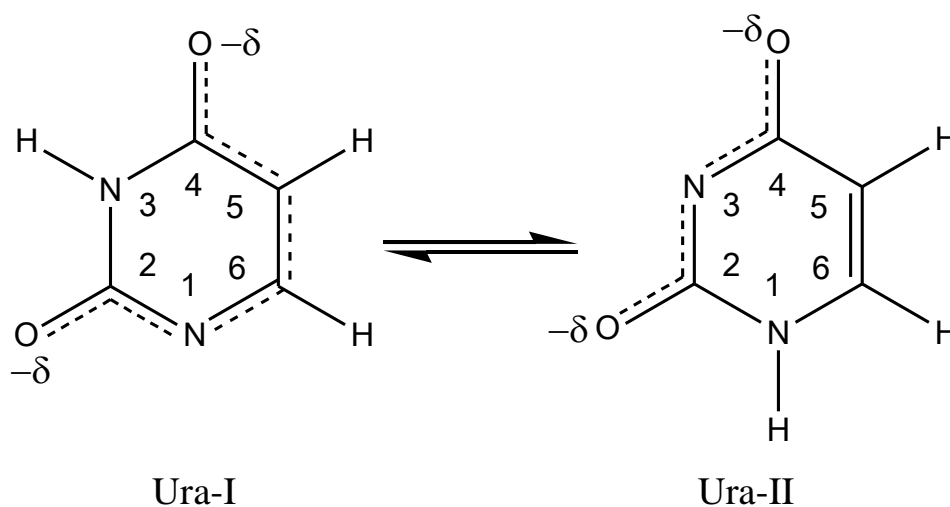


Figura 4. Estruturas da uracila, tautômeros do ânion mesomérico (Giese and McNaughton, 2002).

2.4.2. Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

A figura 5 apresenta os espectros FT-IR dos sólidos obtidos a partir das soluções de uracila em diferentes valores de pH e da solução sem ajuste de pH.

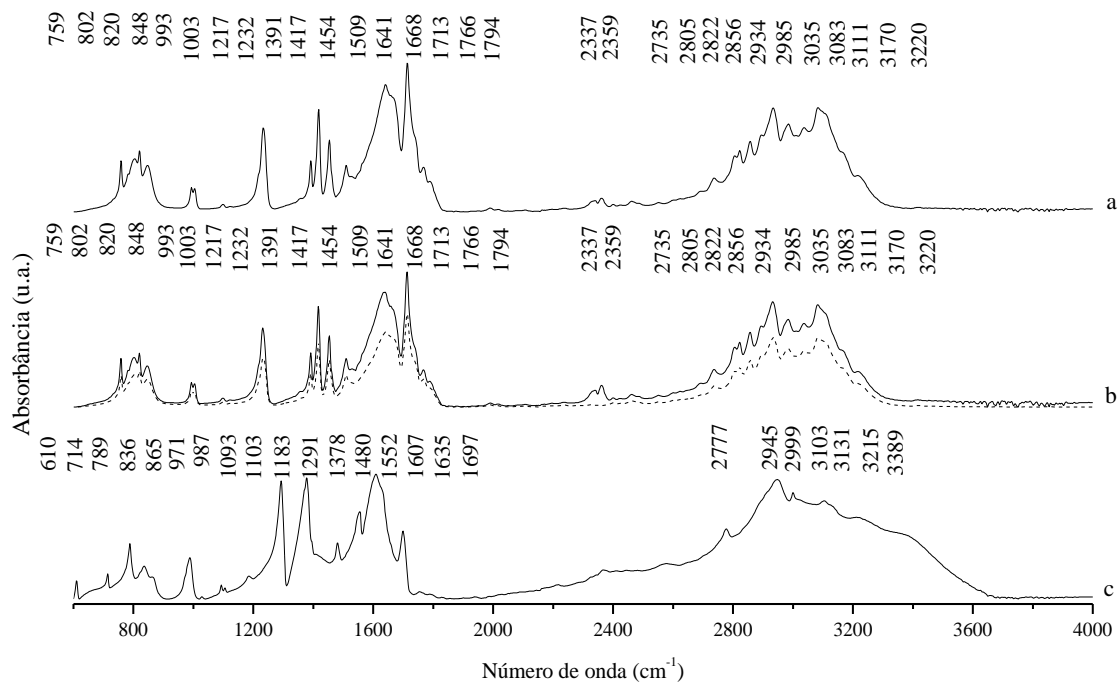


Figura 5. Espectros FT-IR: **a)** uracila liofilizada de água ultra pura, **b)** uracila liofilizada de solução com pH 0,3 (ponto) e pH 2,00 (linha); **c)** uracila liofilizada de solução com pH 12,0.

Observa-se o comportamento similar ao da espectroscopia Raman (Figura 5). Não ocorre aparecimento de novas bandas e nem deslocamentos, provavelmente porque o valor de pH 0,3 é próximo ao valor de pK_{a1} . Para o sólido obtido a partir da solução alcalina é observado o surgimento de novas bandas como em 1291, 1378, 1635 e 1697 cm^{-1} (Figura 5-c). Essas mudanças no espectro eram esperadas, uma vez que a espectroscopia no infravermelho (FT-IR) é sensível às mudanças estruturais.

O conjunto de bandas no espectro da uracila sem ajuste de pH com maior intensidade ocorre na região de 1550 e 1750 cm^{-1} . Foi realizada a deconvolução nesta região e foram encontradas cinco (5) bandas com número de onda de 1632, 1642, 1673, 1713 e 1735 cm^{-1} . As duas bandas em 1713 e 1735 cm^{-1} (Figura 6-a) são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{C}_4=\text{O})$ e $\nu(\text{C}_2=\text{O})$, respectivamente (Barnes et al., 1984). Deve-se notar que a banda em 1735 cm^{-1} não é observada no espectro Raman. De acordo com a atribuição realizada por Singh (2013 e 2015) estes dois estiramentos são atribuídos às bandas 1772 e 1792 cm^{-1} , entretanto, estas frequências

não foram observadas neste trabalho. Esta diferença é devida que os espectros não foram obtidos por acessório ATR (cristal), mas em Nujol (óleo mineral). Quando o espectro FT-IR foi obtido utilizando pastilhas de KBr (Anexo I), observam-se bandas em 1717 e 1740 cm^{-1} com dois ombros em 1771 e 1791 cm^{-1} (Figura 6-b). A banda em 1673 cm^{-1} é atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}_5=\text{C}_6)$, mesmo valor observado para o espectro calculado (Tabela 1). As bandas em 1509, 1451, 1391 e 1232 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ /deformação $\beta(\text{N}_1\text{-H})$, *bending* no plano $\beta(\text{N}_3\text{-H})$, *bending* no plano $\beta(\text{C}_6\text{-H})$ e $\beta(\text{C}_5\text{-H})$, respectivamente (Singh, 2013).

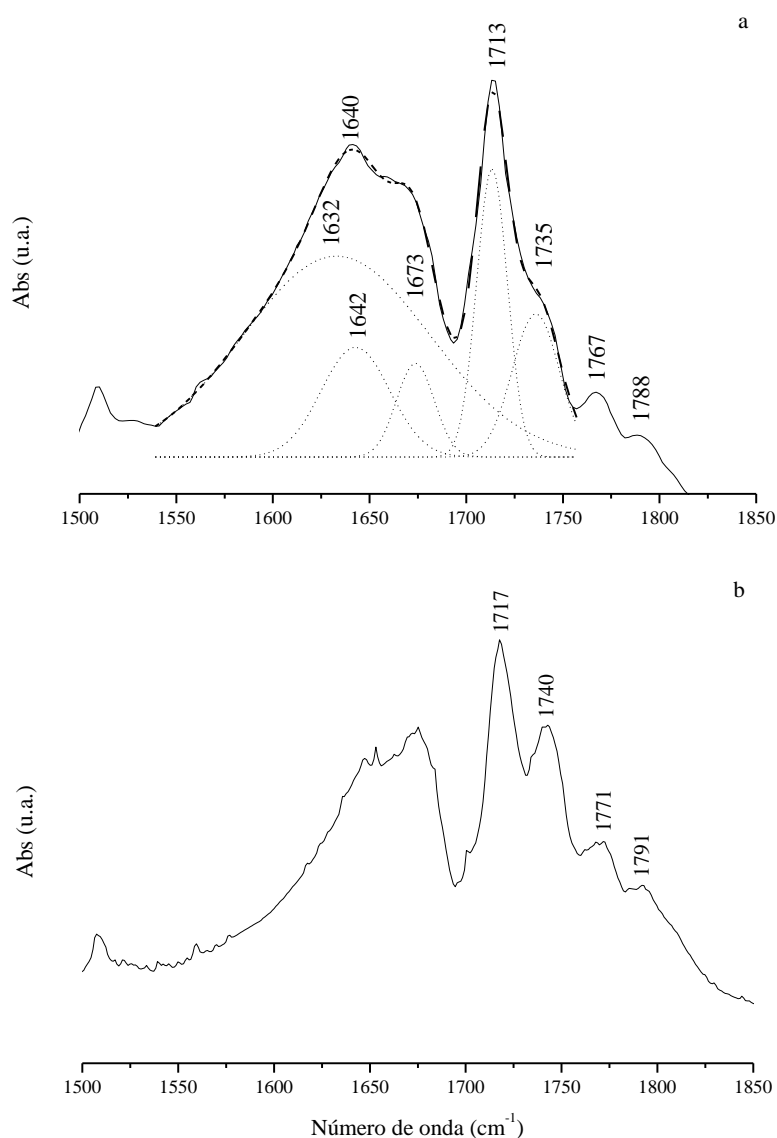


Figura 6. Espectros FT-IR da uracila liofilizada na região de 1500 a 1850 cm^{-1} ; **a)** Espectro FT-IR obtido no módulo de ATR, a melhor regressão foi obtida com cinco bandas ($R^2=0,997$); **b)** Espectro FT-IR obtido em pastilhas de KBr.

Na região abaixo de 1000 cm^{-1} várias frequências em 1003 , 993 , 848 , 820 , 802 e 729 cm^{-1} são atribuídas à deformação no plano $\delta(\text{anel})$, *bending* angular $\alpha(\text{anel})$, *bending* fora do plano $\gamma(\text{N}_3\text{-H})$, *bending* for a do plano $\gamma(\text{C}_6\text{-H})/\gamma(\text{C}_5\text{-H})$, deformação do anel $\delta(\text{anel})$, *bending* fora do plano $\gamma(\text{C}_5\text{-H})$, respectivamente (Tabela 1). As bandas com maiores números de onda ($>2000\text{ cm}^{-1}$) são em sua maior parte devido aos estiramentos $\nu(\text{C}_x\text{-H})$ e $\nu(\text{N}_x\text{-H})$. As bandas em 2822 e 2856 cm^{-1} são atribuídas aos estiramento $\nu(\text{anel})$ e *bending* $\beta(\text{N}_x\text{-H})$, respectivamente. E as bandas 3088 , 3111 e 3220 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{C}_5\text{-H})$, $\nu(\text{N}_3\text{-H})$ e $\nu(\text{N}_1\text{-H})$ respectivamente.

O espectro FT-IR do sólido obtido a partir da liofilização da solução com pH 12,0 apresentou mudanças (Figura 5-c). Ocorreu o desaparecimento das bandas em 1232 cm^{-1} atribuída ao *bending* no plano $\beta(\text{C}_5\text{-H})$ e em 1454 cm^{-1} atribuída ao *bending* no plano $\beta(\text{N}_3\text{-H})$, que pode indicar a formação de Ura-II (Figura 4). É observado também o aparecimento de uma banda em 1378 cm^{-1} de grande intensidade que é relacionada ao *bending* no plano $\beta(\text{C}_6\text{-H})$ (Giese e McNaughton, 2002). Mas, a principal informação adquirida com o espectro FT-IR é o desaparecimento das bandas em 1713 e 1735 cm^{-1} , que são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{C}_4=\text{O})$ e $\nu(\text{C}_2=\text{O})$. Esse desaparecimento indica diminuição do caráter de ligação dupla entre os C_4 e C_2 com os oxigênios. E esse efeito é relacionado com a carga negativa na molécula de uracila.

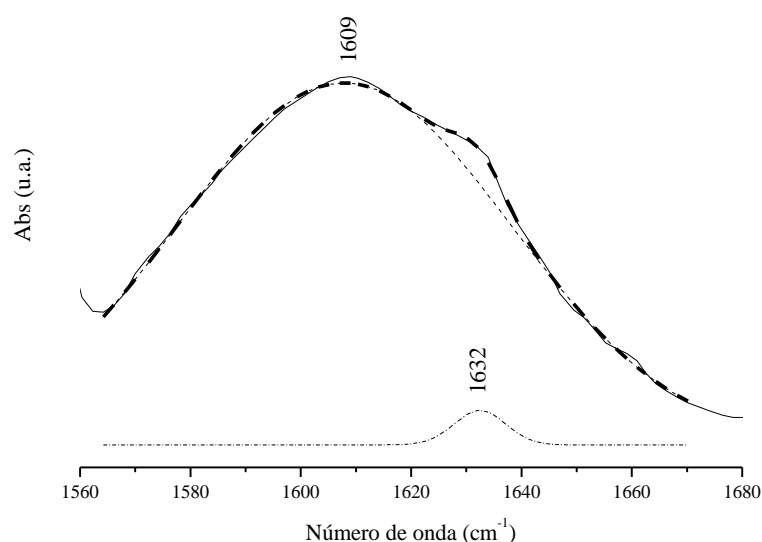


Figura 7. Espectros ATR-FT-IR da uracila liofilizada a partir da solução alcalina na região de 1560 a 1780 cm^{-1} . A melhor regressão foi obtida com duas bandas ($R^2=0,998$)

Foi realizada a deconvolução na região de 1560 a 1780 cm^{-1} do sólido obtido a partir da solução alcalina, e foram encontradas duas bandas (Figura 7). Uma mais intensa e larga em 1609 cm^{-1} e uma segunda banda em 1632 cm^{-1} , em que as duas são atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}_5=\text{C}_6)$ (Barnes e Stuckey, 1984, Leś et al., 1992, Giese e McNaughton, 2002).

Dessa forma, a manutenção de duas bandas atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}_5=\text{C}_6)$, indica que a dupla ligação entre C_5 e C_6 se mantém. Inferindo-se que há maior prevalência da forma tautomérica Ura-II com N_3 carregado negativamente. Giese e McNaughton (2002) afirmam que em solução alcalina há a maior concentração de Ura-II em relação a Ura-I. E isso ocorre devido ao momento de dipolo, maior em Ura-II, ser estabilizado pelo solvente polar (H_2O). Giese e McNaughton (2002) chegaram a esta conclusão por cálculos computacionais, utilizando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de base aug-cc-pVDZ. De acordo com Anizelli *et al.* (2014), o nitrogênio N_3 é desprotonado, mas para o caso de timina. Como a timina possui uma estrutura molecular semelhante à da uracila, realizou-se a comparação. Portanto, a uracila tem como tautômero majoritário Ura-II, quando ocorre desprotonação.

2.4.3. Espectro Raman das soluções de uracila

A figura 8 apresenta os espectros Raman das soluções de uracila com e sem ajuste de pH. Podem ser observadas três bandas principais. As bandas em 785 e 786 cm^{-1} nos espectros obtidos a partir de solução sem tratamento em solução ácida (pH 0,3 e 2,00) são devido ao estiramento $\nu(\text{anel})$. Para a solução alcalina (pH 12,0) é observado o deslocamento para frequências maiores em 798 cm^{-1} (Figura 8-c). Este deslocamento é devido a carga negativa que acontece na molécula, promovendo a deslocalização dos elétrons π no anel (Lord e Thomas, 1967). Este deslocamento também é observado para as amostras liofilizadas (Figura 2-c).

A segunda banda em 1233 cm^{-1} que aparece no espectro obtido da solução sem tratamento (Figura 8-a) desaparece quando a solução é ajustada para pH 12,0 (Figura 8-c). Esta frequência pode ser atribuída ao *bending* $\beta(\text{C}_5\text{-H})$. O desaparecimento desta frequência foi observado por Lord e Thomas (1967), e também ocorre para as amostras sólidas. A terceira banda na região de 1600 a 1650 cm^{-1} possui dois picos em 1636 e 1673 cm^{-1} . A deconvolução dessas bandas mostrou uma somatória de três bandas em 1632, 1656 e 1679 cm^{-1} (Figura 9). Essas bandas são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{C}_5=\text{C}_6)$, $\nu(\text{C}_2=\text{O})$ e $\nu(\text{C}_4=\text{O})$, respectivamente (Anizelli *et al.*, 2014). Para a solução em pH 12,0, essas bandas desaparecem, e apenas a frequência em 1638 cm^{-1} é observada. Isso é interpretado como uma perda do caráter de dupla ligação para C_2 e C_4

(Figura 8-c) e também devido à carga negativa da molécula, promovendo deslocalização dos elétrons π no anel (Lord e Thomas, 1967).

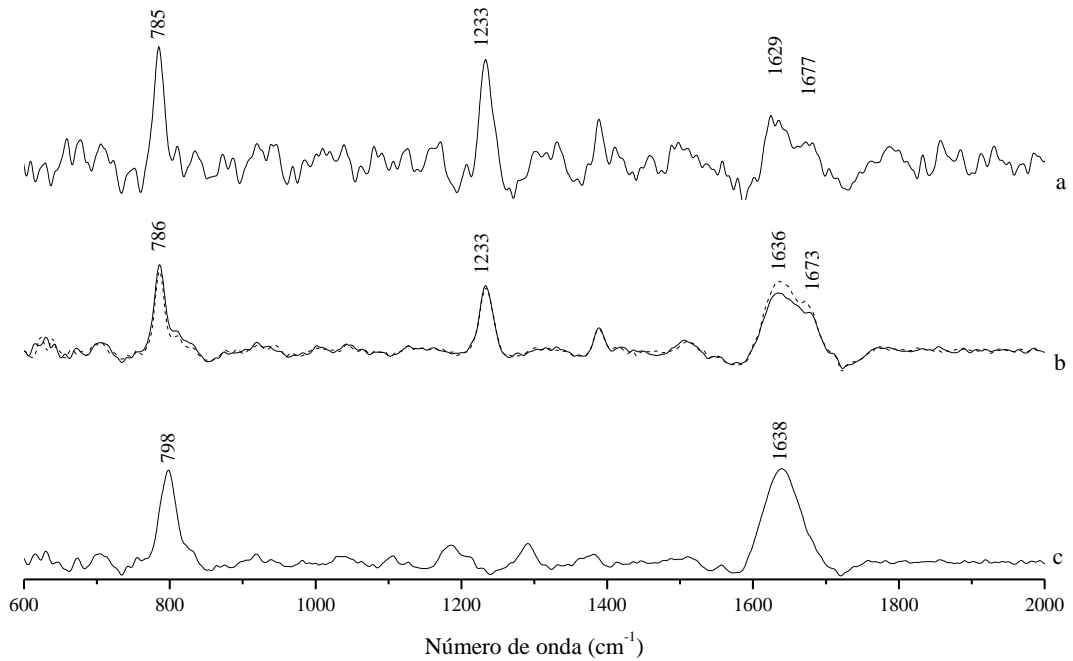


Figura 8. Espectros Raman das soluções: a) sem ajuste; b) pH 0,3 (ponto) e pH 2,00 (linha); c) pH 12,0.

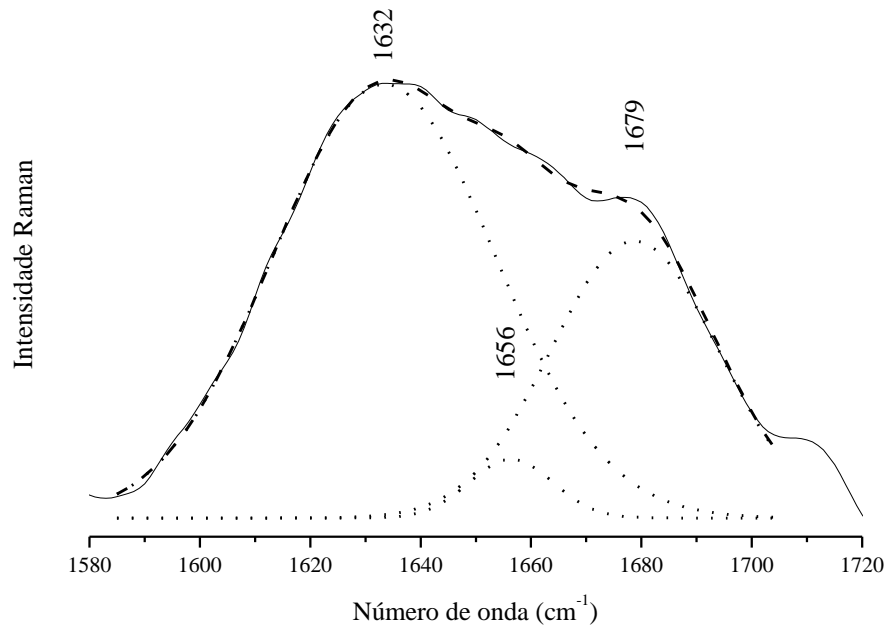


Figura 9. Espectros Raman da solução de uracila na região de 1580 a 1700 cm⁻¹. A melhor regressão foi obtida com três bandas ($R^2=0,998$)

2.4.4. Atribuição da molécula de Uracila

Por meio das análises dos espectros Raman e FT-IR, e comparação com trabalhos da literatura realizou-se a atribuição, por tentativa, dos modos vibracionais da molécula de Uracila. A atribuição foi organizada na forma de tabela (Tabela 1). Entretanto, para auxiliar a atribuição foram utilizados os espectros FT-IR e Raman gerados por cálculos computacionais (Figura 10).

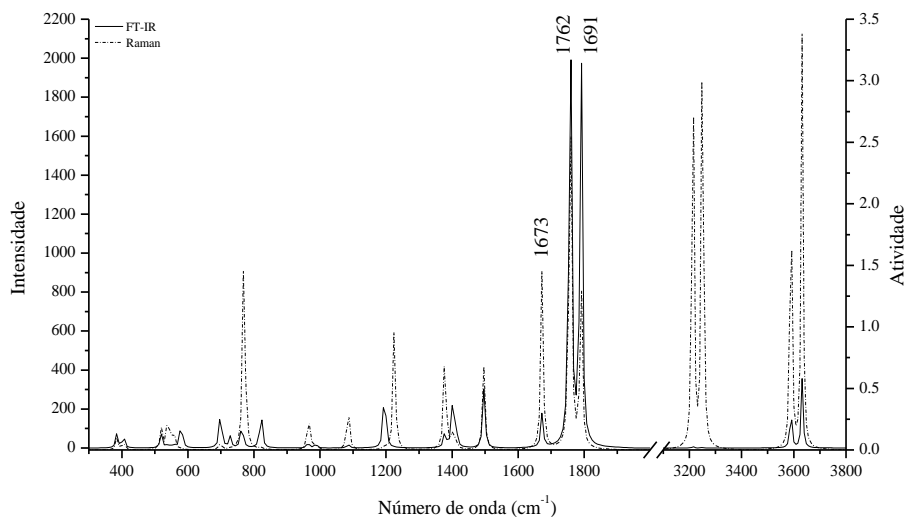


Figura 10. Espectros FT-IR (linha contínua) e Raman (linha pontilhada) gerados por cálculos computacionais.

Quando desprotonada, na forma aniônica, a uracila pode assumir ao menos 6 formas tautoméricas (Goodgame e Jacobovik, 1987). Foram realizados cálculos com as duas formas tautoméricas da uracila (ceto-amino e enol-imínio) (Figura 11). Nos cálculos foi utilizado o efeito do solvente através do modelo de polarização contínua (PCM). Os resultados mostram que a forma ceto-amino é mais estável em relação com enol-imínio, com uma diferença de 18,30 kcal mol⁻¹ para a teoria B3LYP/aug-cc-pvdz.

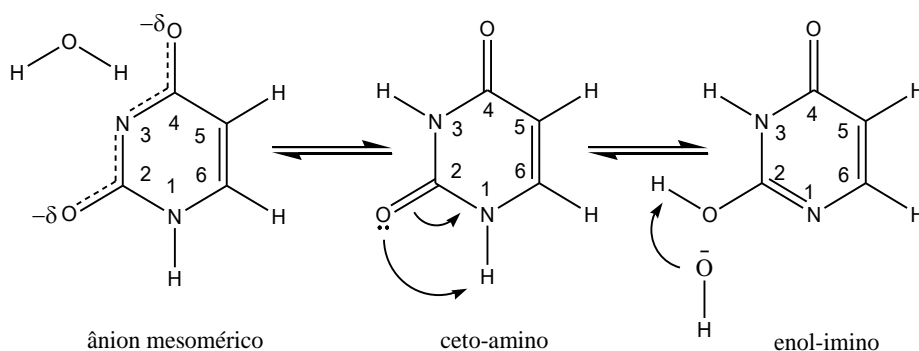


Figura 11. Estruturas da Uracila em solução.

Tabela 1. Atribuição por tentativa dos modos vibracionais da uracila.

Raman		FT-IR				Atribuição		
Observado	Calculado	Barnes (1984)	Singh (2013)	Observado	Calculado		Barnes (1984)	Singh (2013)
-	3633	-	-	-	3630	-	-	-
-	3591	-	-	-	3591	-	-	-
-	3246	-	-	-	-	-	-	-
-	3214	-	-	3220	-	3210	3180	$\nu(\text{N}_1\text{-H})$
-	-	-	3100	3111	-	3110	3160	$\nu(\text{N}_3\text{-H})$
-	-	-	3065	3088	-	3080	3060	$\nu(\text{C}_5\text{-H})$
-	-	-	-	3035	-	-	-	-
-	-	-	-	2985	-	-	-	-
-	-	-	-	2934	-	2935	-	-
-	-	-	-	2856	-	2860	-	-
-	-	-	-	2822	-	2820	-	-
-	-	-	-	2735	-	-	-	-
-	-	-	-	2359	-	-	-	-
2331	-	-	-	2337	-	-	-	-
2326	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1804	1735/1794	1791	1768	1792	$\nu(\text{C}_2=\text{O})$
1714	-	1702	1764	1713	1762	1740	1772	$\nu(\text{C}_4=\text{O})$
1663	1670	-	1670	1673	1673	1673	1675	$\nu(\text{C}_5=\text{C}_6)$
1640/1609	-	1648	-	1642/1632	-	1650	-	
1554	-	-	-	-	-	-	-	-
1505	1497	-	1500	1509	1497	1508	1502	$\delta(\text{N}_1\text{-H})$
1453	-	-	1430	1454	-	1454	1425	$\delta(\text{N}_3\text{-H})$
1418	-	1414	1406	1417	1401	1418	1402	$\nu(\text{anel})$
1393	1374	1392	1380	1391	1375	1391	1380	$\delta(\text{C}_6\text{-H})$
1236	1223	1225	1230	1232	1230	1237	1230	$\delta(\text{C}_5\text{-H})$
-	-	1199	1190	-	1195	-	1194	$\nu(\text{anel})$
1100	1088	-	1086	-	-	1098	1090	$\nu(\text{anel})$
-	-	1004	-	1003	-	1006	-	$\delta(\text{anel})$ i.p.
986	966	-	992	993	-	993	995	$\alpha(\text{anel})$
-	-	-	-	848	-	850	-	$\gamma(\text{N}_3\text{-H})$
-	-	-	-	820	823	823	-	$\gamma(\text{C}_6\text{-H})$ $\gamma(\text{C}_5\text{-H})$
790	-	-	770	802	-	-	770	$\delta(\text{anel})$
-	-	-	724	729	727	-	724	$\gamma(\text{C}_5\text{-H})$

ν , estiramento; β , *bending* no plano; α , *bending* angular; γ , *bending* fora do plano; δ , deformação; ρ , *rocking*; τ , *twisting*.

2.4.5. Espectro UV/Vis das soluções de uracila

A figura 12 apresenta os espectros UV/Vis das soluções de uracila sem ajuste de pH e com valores de pH 2,00 e 12,0. Observa-se que o espectro da solução alcalina apresenta um ombro na banda em 260 nm (Figura 12-I).

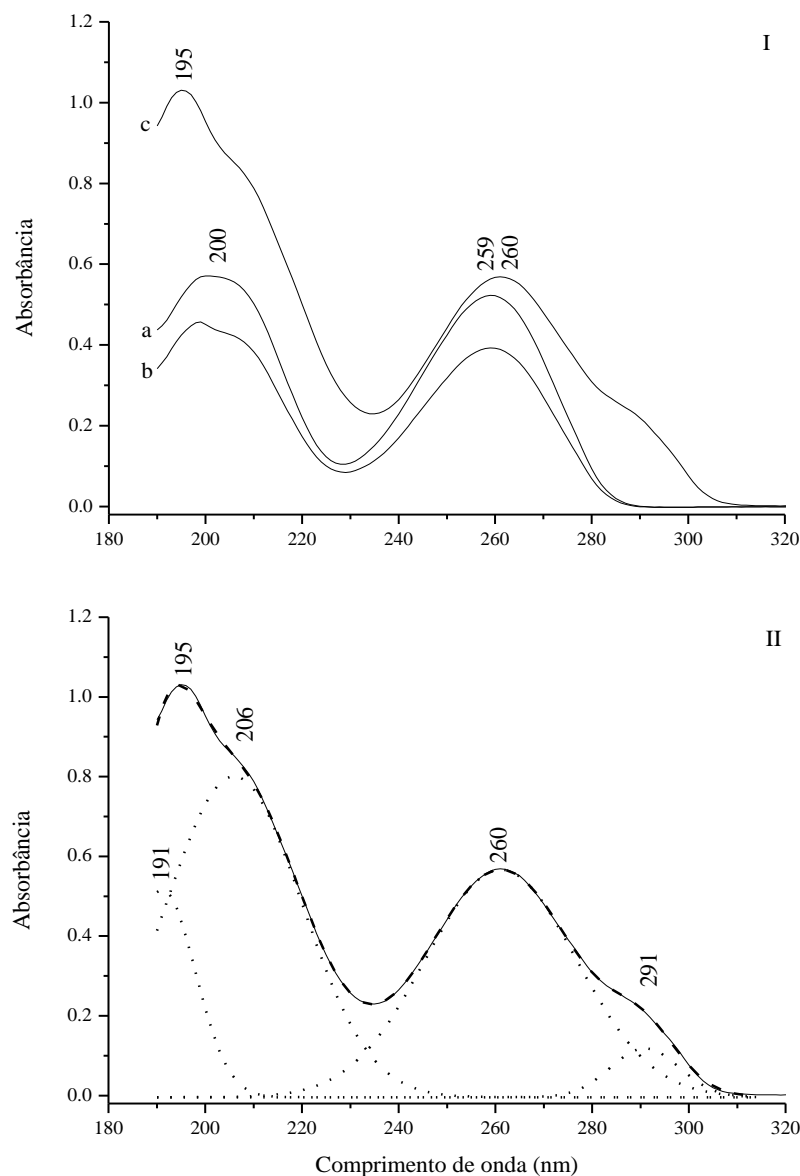


Figura 12. Espectros UV/Vis das soluções: **I)** a) sem ajuste de pH; b) pH 2,00 e c) pH 12,0. **II)** Deconvolução do espectro UV/Vis da solução de uracila em pH 12 na região de 190 a 320 nm. A melhor regressão foi obtida com quatro bandas ($R^2=0,999$).

Deste modo, realizou-se a deconvolução deste espectro, e nesta região são encontradas quatro bandas para a melhor regressão (Figura 12-II). Ocorre o aparecimento de uma banda em 291 nm. Esta nova banda indica uma mudança estrutural na molécula de uracila. Como

observado nas espectroscopias FT-IR e Raman, a uracila em pH 12,0 sofre a desprotonação. Isto resulta na deslocalização de elétrons π no anel da molécula. Portanto as vibrações do anel deslocam para frequências menores, ou seja, maiores comprimentos de onda (desvio para o vermelho) no espectro de absorção eletrônica (Quin *et al.*, 1991). Este resultado é mais um indicativo de que na molécula de uracila ocorre a desprotonação em solução alcalina.

2.4.6. Interação da uracila com os sais da água do mar

As figuras 13 e 14 apresentam os espectros FT-IR e Raman, respectivamente, dos sólidos obtidos da liofilização das quatro águas do mar utilizadas neste estudo (0,0 Ga, 4,0 Ga, 3,2-S Ga e 3,2-H Ga). Os espectros FT-IR das águas do mar apresentam bandas muito largas na região de 2800 a 3800 cm^{-1} . Essas bandas são devido a hidratação dos sais presentes. As bandas largas na região entre 3338 – 3355 cm^{-1} são devido ao estiramento $\nu(\text{O-H})$. As bandas na região entre 1623 – 1635 cm^{-1} são atribuídas ao *bending* $\beta(\text{H-O-H})$ (Ferraro e Waler, 1965; Ault, 1978). E as bandas na região entre 1078 – 1085 cm^{-1} são devido estiramento $\nu(\text{O-H})$ e também aos íons sulfato (SO_4^{2-}).

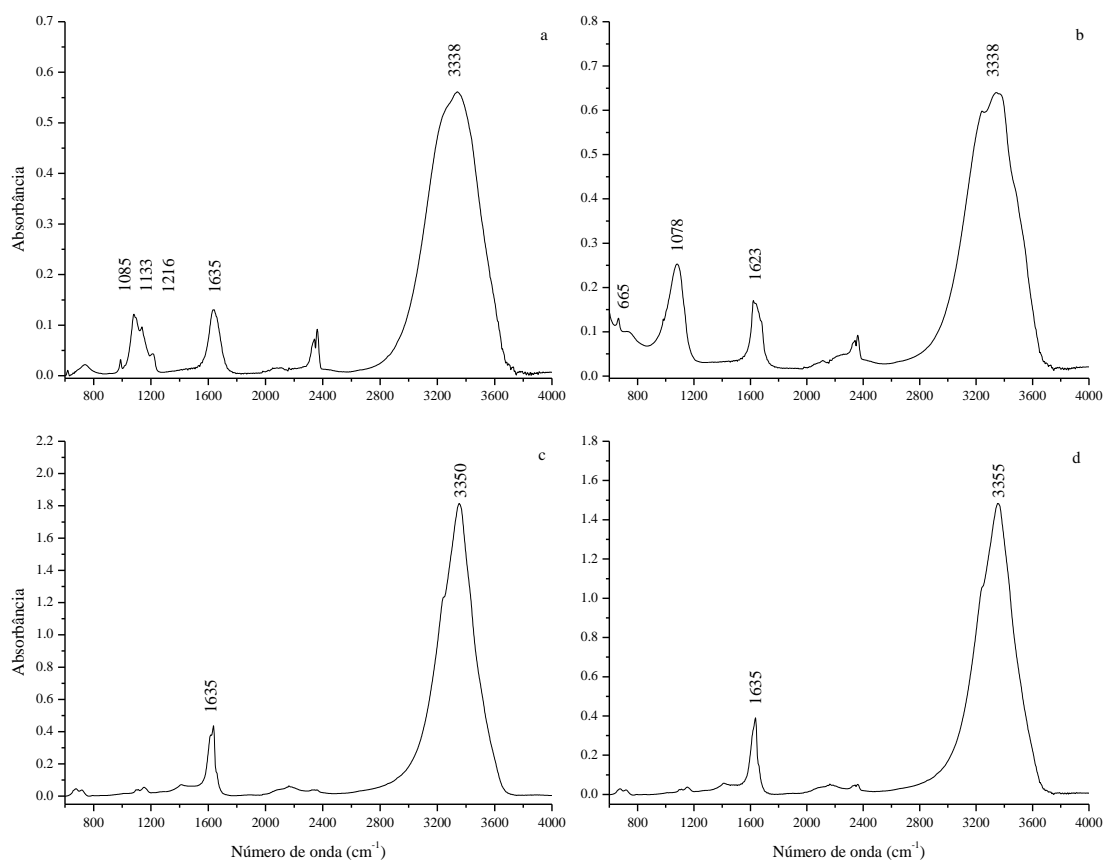


Figura 13. Espectros FT-IR dos sólidos obtidos a partir da liofilização das soluções de água do mar: **a)** 0,0 Ga; **b)** 4,0 Ga; **c)** 3,2-S Ga; **d)** 3,2-H Ga.

As bandas referentes à hidratação dos sais, por sua vez, não são observadas no espectro Raman (Figura 14). Isso ocorre devido a regra de seleção para cada modo de vibração nas moléculas. Para a água (H_2O), seus modos de vibração são ativos para o FT-IR, mas não são ativos para o Raman (Nakamoto, 1978). Por isso, o espectro Raman não apresenta bandas da água. Os espectros Raman dos sólidos obtidos das águas do mar 0,0 Ga e 4,0 Ga apresentam duas bandas em 983 e 1004 cm^{-1} , respectivamente (Figura 14-a, b). As duas bandas são atribuídas aos íons sulfato (SO_4^{2-}) presente nas águas do mar. As bandas de sulfato não são observadas para as águas do mar 3,2-S Ga e 3,2-H Ga. Deve ser ressaltado que ambas soluções possuem menor concentração do íon sulfato em sua formulação.

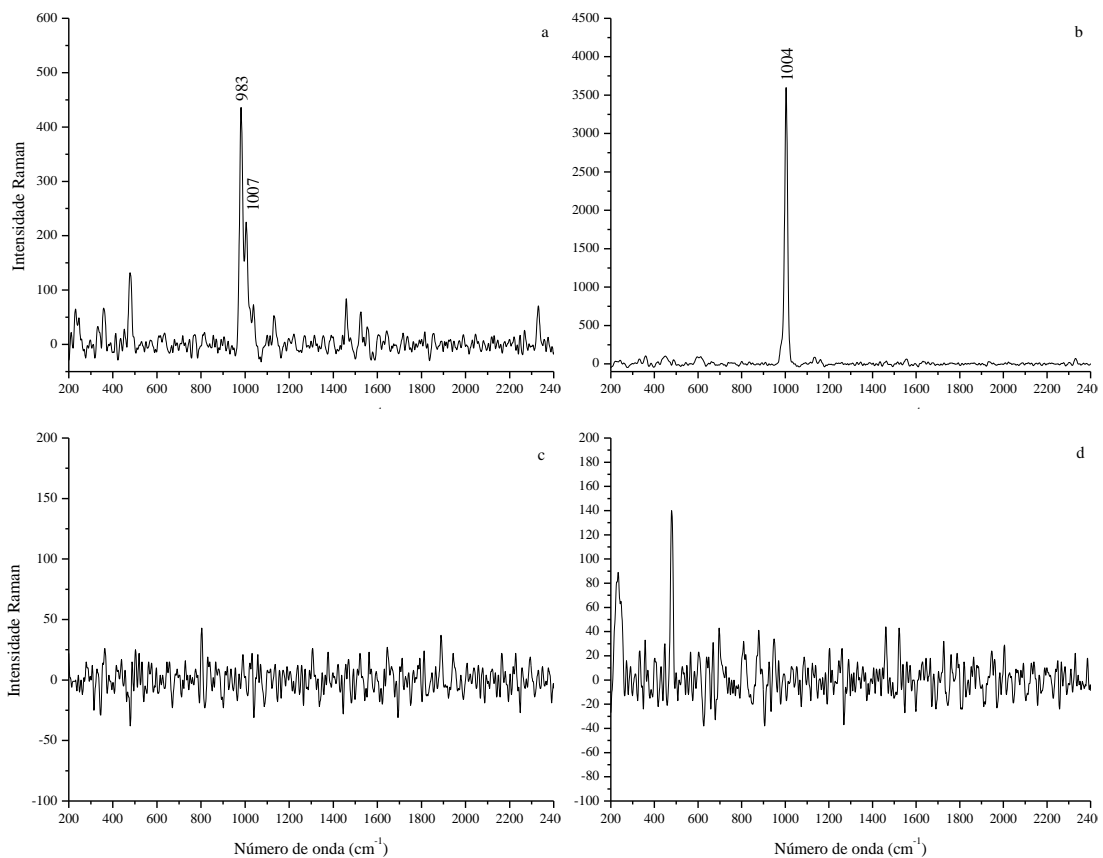


Figura 14. Espectros Raman dos sólidos obtidos a partir da liofilização das soluções de água do mar: a) 0,0 Ga; b) 4,0 Ga; c) 3,2-S Ga; d) 3,2-H Ga.

A figura 15 apresenta os espectros FT-IR das amostras de uracila obtidas da liofilização das soluções em água do mar. Para as águas do mar 0,0 e 4,0 Ga, é possível observar alguma modificação apenas na região acima de 1600 cm^{-1} . Pois, as bandas na região de 1100 cm^{-1} possuem bandas muito largas (Figura 15-a, b). Ocorre o aparecimento de uma banda de baixa intensidade em 1743 e 1741 cm^{-1} , respectivamente. Essa região no espectro para uracila é

atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}_4=\text{O})$, e isso deve indicar uma interação dos íons presentes nas águas do mar com o grupo carbonila ($\text{C}_4=\text{O}$) da molécula. Para as águas do mar 3,2-S Ga e 3,2-H Ga não foram observadas nenhuma modificação, pois as bandas que aparecem são de baixa intensidade (Figura 16-c, d).

Nos espectros Raman, para as águas do mar 0,0 e 4,0 Ga, são observadas bandas com frequências em 1659 e 1657 cm^{-1} , respectivamente (Figura 16-a, b). Essas bandas podem ser interpretadas como um deslocamento da banda em 1714 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}_4=\text{O})$. Portanto, correlacionando os dados experimentais com os dados teóricos, pode-se inferir que este deslocamento para menores frequências soa devido a interação do grupo carbonila ($\text{C}_4=\text{O}$) com os cátions presentes nas águas do mar.

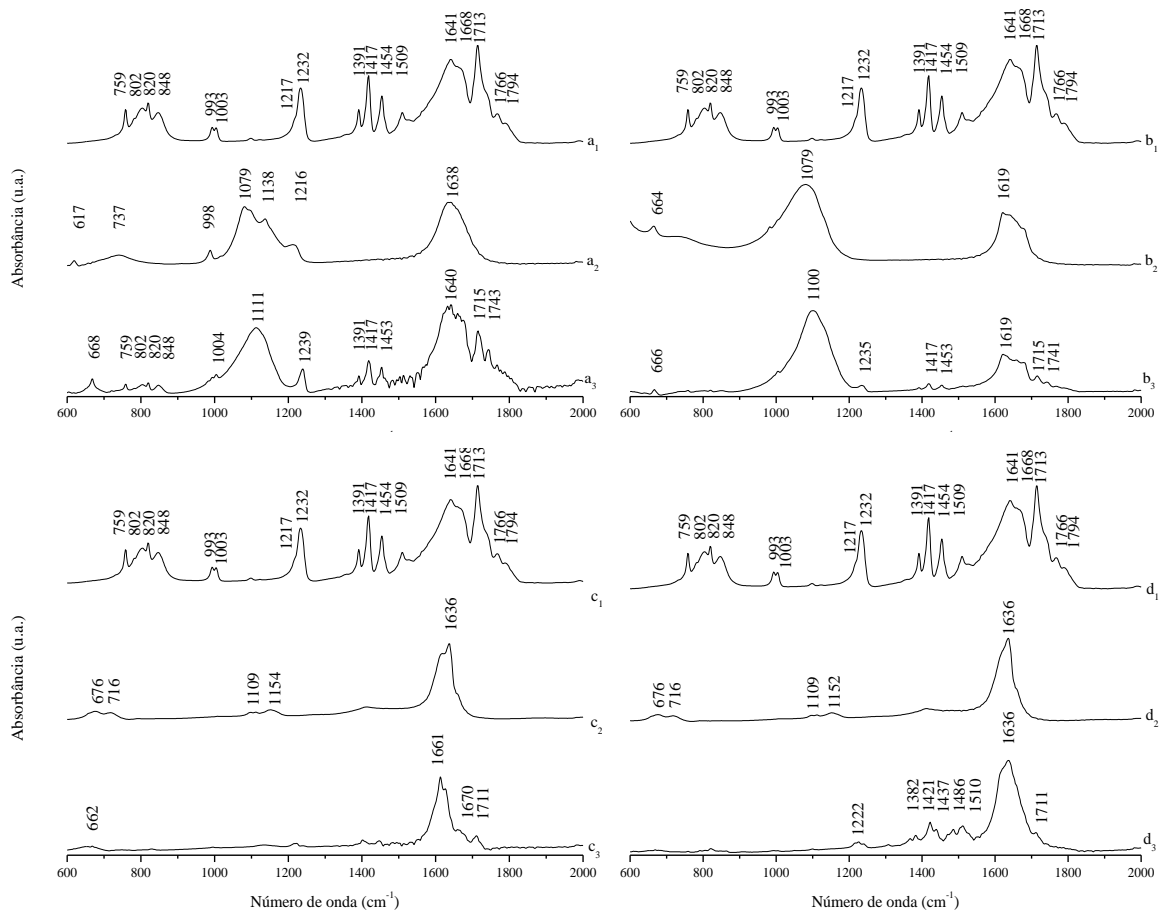


Figura 15. Espectros ATR-FT-IR dos sólidos obtidos liofilização das soluções de: **a₁**) uracila sem tratamento; **a₂**) 0,0 Ga; **a₃**) uracila em 0,0 Ga; **b₁**) uracila sem tratamento; **b₂**) 4,0 Ga; **b₃**) uracila em 4,0 Ga; **c₁**) uracila sem tratamento; **c₂**) 3,2-S Ga; **c₃**) uracila em 3,2-S Ga; **d₁**) uracila sem tratamento; **d₂**) 3,2-H Ga; **d₃**) uracila em 3,2-H Ga.

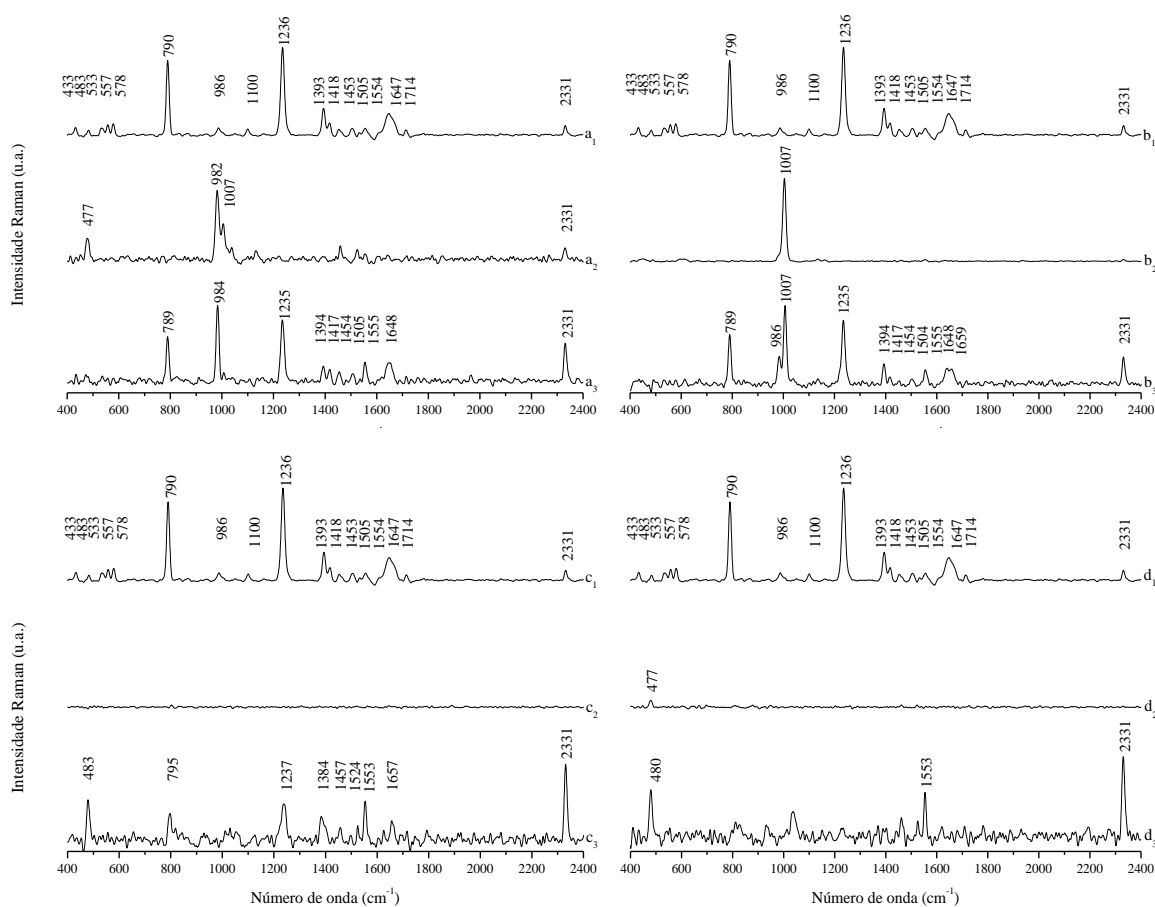


Figura 16. Espectros Raman dos sólidos obtidos liofilização das soluções de: **a₁**) uracila sem tratamento; **a₂**) 0,0 Ga; **a₃**) uracila em 0,0 Ga; **b₁**) uracila sem tratamento; **b₂**) 4,0 Ga; **b₃**) uracila em 4,0 Ga; **c₁**) uracila sem tratamento; **c₂**) 3,2-S Ga; **c₃**) uracila em 3,2-S Ga; **d₁**) uracila sem tratamento; **d₂**) 3,2-H Ga; **d₃**) uracila em 3,2-H Ga.

2.4.7. Cálculos Computacionais

Cálculos teóricos das duas possíveis formas tautoméricas da uracila (ceto-amino e enol-imínio) foram realizados (Figura 11). O efeito do solvente foi calculado usando o modelo de polarização contínua (PCM – Polarizable Continuum Model). O PCM considera uma solução com o soluto infinitamente diluído no solvente, e em equilíbrio. Os resultados dos cálculos demonstram que o modelo ceto-amino é mais estável que o modelo enol-imínio, com a diferença de 18,30 kcal mol⁻¹, baseado na teoria B3LYP/aug-cc-pVDZ. Portanto, a estrutura ceto-amino foi usada para os cálculos com os metais Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ e Sr²⁺.

A tabela 2 apresenta os resultados dos cálculos teóricos da uracila livre, uracila com o efeito do solvente, e uracila complexada com os cátions metálicos Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ e Sr²⁺ pelos grupos C₂=O e C₄=O (complexos A e B, respectivamente). Quando comparadas as energias da

uracila livre e com efeito do solvente pode-se observar que a última possui menor energia e este resultado indica que o efeito solvente estabiliza a molécula de uracila (Tabela 2).

Tabela 2. Distância de ligação, estiramentos $C_2=O$, $C_4=O$ e $C_5=C_6$, energia relativa para os complexos de uracila com Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} e Sr^{+2} em diferentes posições.

Complexo	Uracila		Na^+		Mg^{2+}		Ca^{2+}		Sr^{2+}	
	(Livre)	(H_2O) [*]	A	B	A	B	A	B	A	B
$E_{rel}(kcal/mol)^*$	0	-19,42	0	-4,10	0	-10,87	0	-9,11	0	-9,25
$E_{rel}(Gcal/mol)^{**}$	0		-0,102		-0,125		-0,425		-1,957	
$r(C_2=O)$ (Å)	1,2206	1,2191	1,2488	1,2095	1,2072	1,1903	1,2515	1,1995	1,2907	1,2016
$\nu(C_2=O)$ (cm^{-1})	1790	1753	1724	1829	1721	1887	1670	1862	1679	1859
$r(C_4=O)$ (Å)	1,2235	1,2215	1,2118	1,2502	1,1907	1,2731	1,1978	1,2884	1,2022	1,2847
$\nu(C_4=O)$ (cm^{-1})	1757	1703	1800	1693	1876	1645	1839	1612	1835	1616
$r(C_5=C_6)$ (Å)	1,3545	1,3528	1,3516	1,3637	1,3430	1,3922	1,3544	1,3763	1,3582	1,3772
$\nu(C_5=C_6)$ (cm^{-1})	1672	1664	1685	1646	1671	1559	1693	1647	1694	1655

*Estrutura calculada com o efeito de solvente (PCM).

**Energia relativa calculada ($kcal\ mol^{-1}$) entre as duas estruturas para Uracila e complexos com Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+} .

***Energia relativa calculada ($Gcal\ mol^{-1}$) entre as estruturas para Uracila e complexos com Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+} .

Nos complexos A e B a uracila interage pelos grupos $C_2=O$ e $C_4=O$, respectivamente (Figura 17). Quando comparadas as posições em que a uracila pode se complexar com os cátions (complexos A e B), a mesma possui menor energia para o complexo B (Tabela 2) em todos os casos (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+}). Para os dois modelos, quando ocorre a ligação entre o metal e a carbonila, a distância da ligação ($C=O$) aumenta e o número de onda diminui, comparando com a uracila livre. Deve-se notar que a frequência da ligação $C_5=C_6$ diminui, e o comprimento da ligação se torna maior para o complexo B, quando comparado com a uracila livre. A variação da distância de ligação (Δr , equação 1) da carbonila ($C_4=O$) foi de +0,0298, +0,0523, +0,0670 e +0,0623 Å para as interações com Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+} , respectivamente (Tabela 2). Isso pode ser explicado devido ao sistema conjugado formado com $C_4=O$, o que resulta na diminuição de energia e maior estabilidade.

$$\Delta r = r_{(uracila-metal)} - r_{(uracila\ livre)} \quad (\text{Equação 1})$$

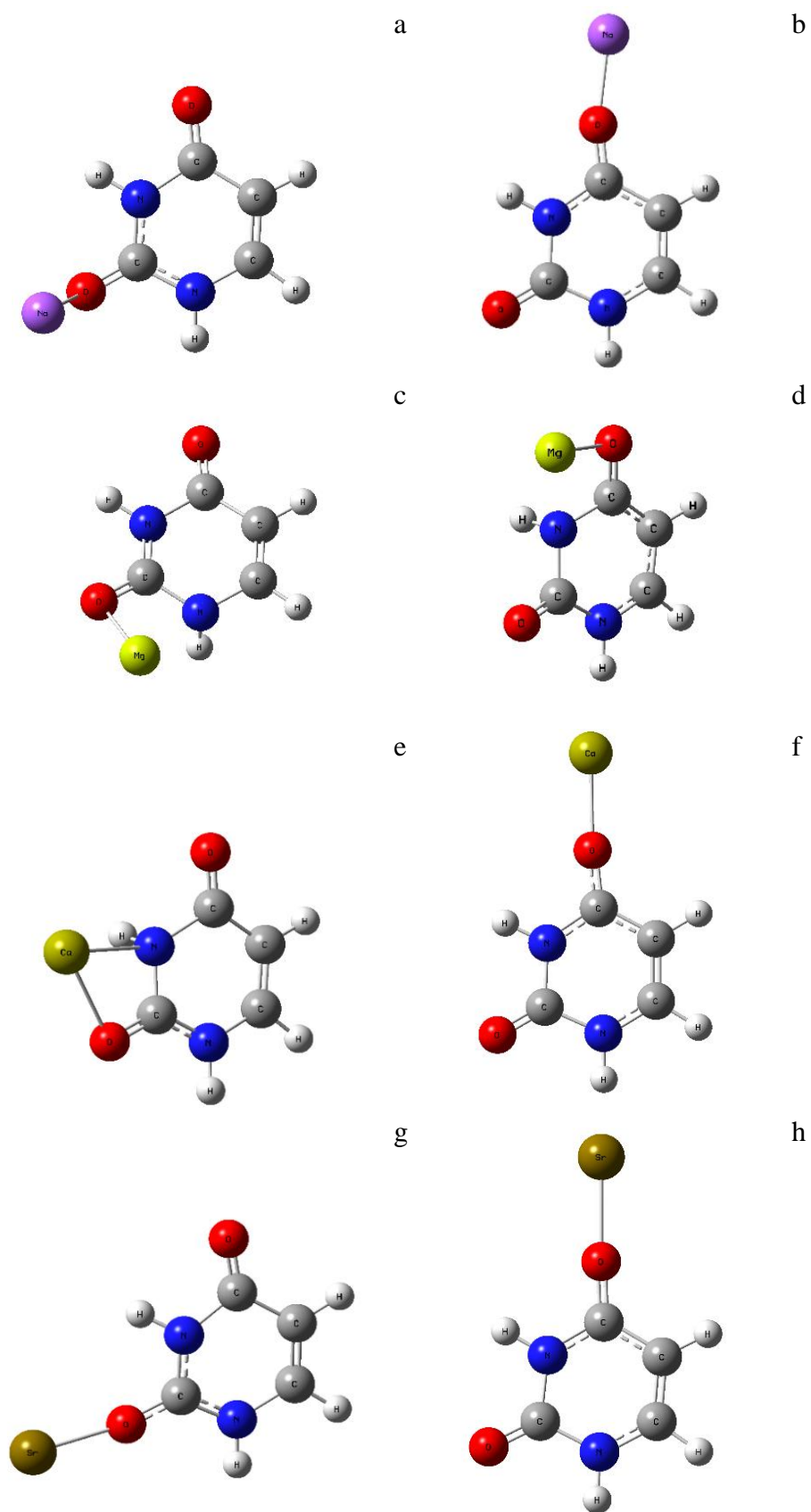


Figura 17. Representação tridimensional das estruturas dos complexos com variados íons: **a)** A com Na⁺; **b)** B com Na⁺; **c)** A com Mg²⁺; **d)** B com Mg²⁺; **e)** A com Ca²⁺; **f)** B com Ca²⁺; **g)** A com Sr²⁺; **h)**

B com Sr^{2+} . Esferas coloridas representam os átomos dos elementos: cinza – Carbono (C); branco – Hidrogênio (H); azul – Nitrogênio (N); vermelho – Oxigênio (O), amarelo – metais magnésio (Mg), cálcio (Ca) e estrôncio (Sr), e roxo – metal sódio (Na).

Quando comparadas as energias dos complexos propostos pelo tipo de cátion metálico, é verificado que os cátions estabilizam a molécula de uracila. Dessa forma, a energia dos complexos se dá pela sequência $\text{Sr}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Na}^+$ (Tabela 2).

2.5. Discussão

2.5.1. Reatividade da uracila para a formação de nucleosídeos

Uma vez que nucleosídeos são importantes moléculas para os seres vivos, a interação entre bases nitrogenadas e uma molécula de pentose é de grande interesse para a Química Prebiótica. A figura 18 apresenta um esquema geral para a reação de formação de nucleosídeos.

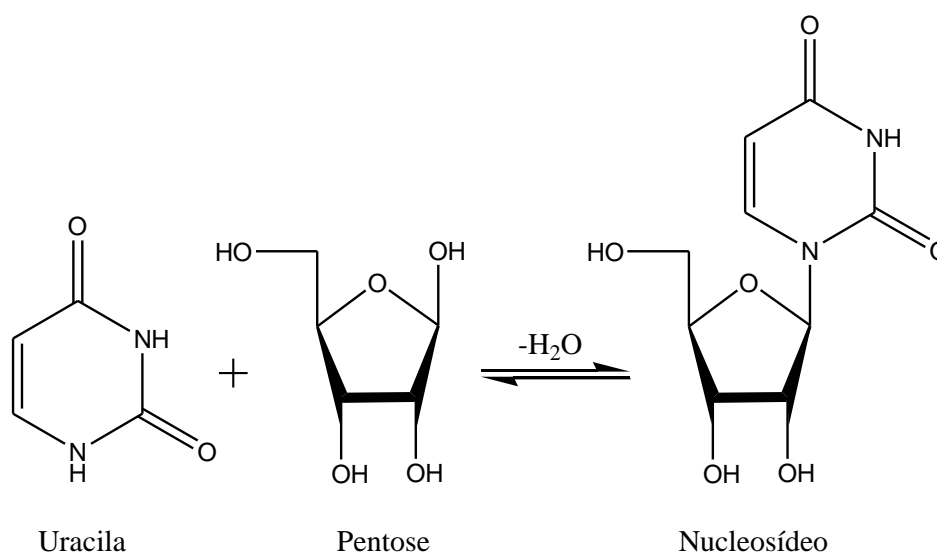


Figura 18. Esquema para reação de formação de nucleosídeos (adaptado de Šponer *et al.*, 2011).

Portando, a presença de cátions bivalentes, como Mg^{2+} , atuando como catalisador pode ter realizada um papel importante na formação de nucleosídeos (Šponer *et al.*, 2011). Uma vez que se tenha dois possíveis tautômeros para a uracila, comparou-se a reatividade, considerando a nucleofilicidade do nitrogênio N_1 e a energia dos orbitais HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) (Balachandran *et al.*, 2013). A figura 19 ilustra os orbitais para os tautômeros ceto-amino e enol-imínio da uracila.

A nucleofilicidade é dada pela carga no nitrogênio N_1 . Neste estudo, foi comparada a carga Mulliken para todas as espécies. Quanto menor a carga (mais negativa), maior a

nucleofilicidade do átomo. Este fenômeno ocorre porque a polarização aumenta e os elétrons do nitrogênio N_1 movem-se em direção ao açúcar mais facilmente. Para a uracila, a carga Mulliken do nitrogênio N_1 para a forma ceto-amino e enol-imínio é de -0,092 e -0,250, respectivamente (Tabela 3). Por consequência, a forma enol-imínio possui menor carga e maior nucleofilicidade quando comparada com a forma ceto-amino. Deve ser salientado que a forma enol-imínio possui maior energia, portanto, menos estável.

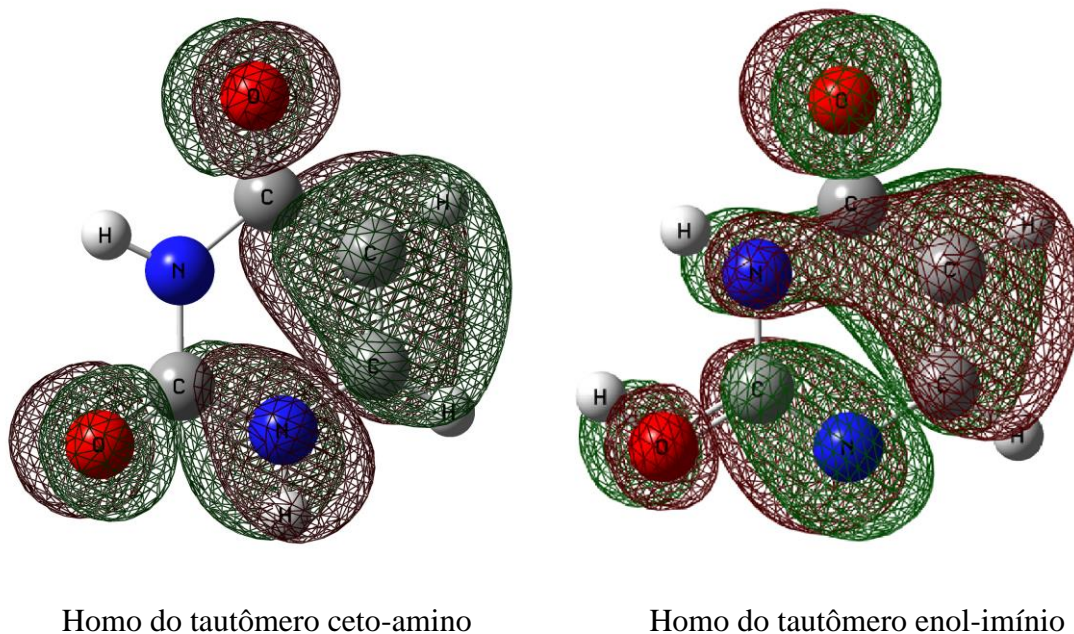


Figura 19. Orbitais HOMO dos tautômeros ceto-amino e enol-imínio da uracila.

É importante para a formação de nucleosídeos que a energia do HOMO (base nitrogenada) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) da pentose sejam próximas (Anizelli *et al.*, 2014). Isso implica em uma interação mais efetiva entre as espécies. Os orbitais HOMO da forma ceto-amino e enol-imínio de -0,268 e -0,254 eV, respectivamente (Tabela 3). Esses valores são próximos e indicam que a reatividade de ambos é similar.

Na forma enol-imínio, ambos nitrogênios N_1 e N_3 contribuem para a formação do orbital HOMO. Por outro lado, a forma ceto-amino ocorre apenas a contribuição do nitrogênio N_1 (Figura 19).

Analisando a interação da uracila com os cátions Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+} , pode-se inferir sobre a reatividade. A tabela 3 mostra a carga Mulliken do nitrogênio N_1 dos diferentes metais nos complexos A e B. Deve ser pontuado que os complexos B da uracila devem ser mais predominantes, uma vez que apresenta maior estabilidade, menor energia, são mais facilmente formados. Para todos os casos, carga negativa ocorre no nitrogênio N_1 (Tabela 3).

Tabela 3. Carga do nitrogênio N₁ e energia do HOMO para uracila.

Uracila	Livre	Complexo	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Sr ²⁺
Carga de N ₁	-0,092	A	-0,044	-0,261	-0,054	-0,038
Energia do HOMO (eV)	-0,268		-0,391	-0,599	-0,510	-0,504
Carga de N ₁	-	B	-0,096	-0,046	-0,093	-0,095
Energia do HOMO (eV)	-		-0,391	-0,592	-0,512	-0,506

A reação de formação de nucleosídeos pode ocorrer por meio de substituição nucleofílica (Figura 18), onde a base nitrogenada age como um nucleófilo com carga negativa no N₁, atacando a pentose (substrato). Pérez-Villa *et al.*, (2018) demonstraram a formação de nucleosídeos, onde a adenina e uracila desprotonada são nucleófilos (carga parcial negativa no N₁) e ataca a ribose fosfatada (carga parcialmente positiva no carbono ligado ao grupo fosfato). A interação do Sr²⁺, Ca²⁺ e Na⁺ com uracila promove a carga no N₁ igual ou mais negativa que a uracila livre. Como pontuado anteriormente, quanto menor a carga, maior a nucleofilicidade do átomo, deste modo, pode-se assumir que estes complexos poderiam ter desempenhado um papel na formação de nucleosídeos. Deve ser salientado que o menor valor da carga de Mulliken ocorre quando uracila complexada com o cátion Mg²⁺ para a forma ceto-amina. Entretanto, é a forma tautomérica com maior energia, tornando-a menos disponível para reação. Para todos os complexos calculados, a energia do orbital HOMO diminui quando na presença dos metais, o que poderia facilitar o início da reação. Concluindo, para melhor entendimento, investigações futuras que promovam resultados experimentais acerca da reação de formação de nucleosídeos no contexto da Química Prebiótica devem ser submetidas utilizando análogos de água do mar, uma vez que bases nitrogenadas interagem fortemente com os cátions.

2.6. Conclusões

A investigação, por técnicas espectroscópicas, da uracila apresentou mudanças nos espectros FT-IR e Raman para as amostras sólidas obtido da liofilização de solução alcalina e em solução alcalina, com valor de pH igual a 12,0. Pois, ocorre a desprotonação da molécula com maior contribuição no nitrogênio N₃ do que para o N₁.

Os sólidos obtidos com as águas do mar apresentaram poucas bandas e com auxílio dos cálculos computacionais pode-se concluir que a interação com os cátions metálicos estabiliza a

molécula. A maior estabilização ocorre com os cátions bivalentes, e a interação acontece preferencialmente com o grupo carbonila ($C_4=O$). Esse estudo apresenta relevância para a química prebiótica, pois demonstra como a uracila irá interagir com sais presentes nas águas do mar.

Cálculos teóricos também mostraram que a reatividade da molécula muda na presença dos cátions, quando a nucleofilicidade e a energia dos orbitais HOMO são analisadas. Os resultados das interações dos cátions metálicos com uracila são importantes para a química prebiótica, uma vez que alterações nas energias e reatividades indicam caminhos para a Evolução Química.

3. Radiólise de adenina em meio salino

Neste capítulo, a radiólise de adenina sólida e aquosa foi investigada. A irradiação gama de adenina sólida obtida a partir da liofilização de soluções em água destilada e água do mar resultou em pequena decomposição. Para a amostra com sais da água do mar detectou-se interação da radiação com íon sulfato. Por outro lado, a irradiação de adenina em solução aquosa resultou na decomposição e produção de espécies oxidadas, como 8-hidroxiadenina e N₁-óxido de adenina. Entretanto, no ensaio de irradiação de adenina em solução de água do mar (4,0 Ga) se obteve menor taxa de decomposição que em água destilada. Esse comportamento é atribuído à presença dos sais dissolvidos que interagem com os radicais provenientes da interação da água com radiação gama. Estes resultados endossam a necessidade de se utilizar modelos de água do mar em experimentos de Química Prebiótica.

3.1. Introdução

A partir de uma perspectiva astrobiológica, adenina (Figura 1), uma base nitrogenada e purina presente no DNA/RNA é uma importante molécula. Sua síntese abiótica foi demonstrada anteriormente (Basile, 1984) e foi encontrada em meteoritos (Hayatsu, 1975). Portanto, é plausível supor que adenina estava presente na Terra Primitiva, sendo uma forte candidata para experimentos em Química Prebiótica.

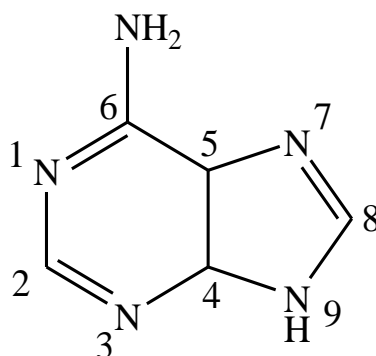


Figura 1. Estrutura molecular da adenina.

Simular condições da Terra Primitiva em experimentos de Química Prebiótica é importante para garantir a confiabilidade dos resultados. Condições como salinidade e valor de pH da água do mar são passíveis de modelar (Zaia, 2012). Por exemplo, a razão de concentração de $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ e $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$ na água do mar diferem da razão encontrada na água do mar atual. Da mesma forma, a Terra Primitiva possui grandes fontes de energia na forma de radiação ionizante (^{40}K , ^{232}Th , ^{235}U , ^{238}U , ^{244}Po) (Negron-Mendoza, 2016). Radiação gama é resultado do efeito de decaimento radioativo de um núcleo atômico. Está radiação é denotada como radiação ionizante por causa de sua alta energia (Allen, 1961). Em experimentos de química prebiótica são usadas como fontes de radiação ionizante ^{40}K e ^{60}Co para simular os efeitos da radiação gama (Negron-Mendoza, 2016). Portanto, experimentos usando radiação ionizante são necessários para entender o comportamento da estabilidade e decomposição de biomoléculas candidatas para Evolução Química.

A radiólise de adenina tem sido objeto de investigações anteriores (Conlay, 1963, Ponnampertuma, 1963, Van Hemmen, 1971, Yamamoto, 1980; Yamamoto e Fuji, 1986, Hartmann *et al.*, 2007 e Su *et al.*, 2011). Foi reportado que adenina não é facilmente decomposta por interação com radiação ionizante. Ocorrem alguns produtos de decomposição, como radicais modificados de derivados de adenina (*radical modified adenine derivatives*) tais como N_x -óxidos de adenina (*adenine N_x -oxides*) e hidroxadenina (*hydroxyl-adenine*), outras bases, como xantina e hipoxantina, e espécies com o anel aberto.

Foi publicado que a radiólise de citosina resulta em uma reação de deaminação produzindo uracila, outra base nitrogenada (Cruz-Castañeda, 2016). Por outro lado, os efeitos na água do mar pela radiação ionizante não são, todavia, entendidos (Draganić, 2005). A radiólise de água do mar é um assunto importante para a química de radiações, uma vez que pode alterar a quantidade de produtos pela radiólise da água (Kumagai, 2013, Hata, 2015 e 2016).

Adenina foi medida por espectrofotometria (UV-Vis) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os produtos da radiólise de adenina foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência aplicada a um espectro de massas (HPLC-Mass) e espectroscopia no infravermelho (FT-IR). Cálculos teóricos foram realizados de modo a elucidar os possíveis produtos de decomposição, por otimização de geometria, simulação do espectro vibracional e comparação de energia relativa.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo Geral

Investigar o comportamento da base nitrogenada adenina quando exposta à radiação ionizante no estado sólido e em solução de água destilada e água do mar 4,0 Ga, pois, está representa um ambiente anterior à datação do primeiro ser vivo.

3.2.2. Objetivos Específicos

Caracterizar as interações da radiação gama com sólidos obtidos da liofilização de adenina aquosa em água destilada e água do mar (4,0 Ga), utilizando as espectroscopias Raman e de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

Quantificar e caracterizar a recuperação de adenina em água ultra pura, soluções salinas e em água do mar (4,0 Ga) quando exposta à radiação gama.

Identificar possíveis produtos de degradação e relacionar as informações no contexto de química prebiótica.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Vidrarias

Todas vidrarias utilizadas nos ensaios de irradiação foram limpas de acordo com os procedimentos de química de radiações. As vidrarias foram submetidas a uma mistura quente de HNO₃ e H₂SO₄ por 4h, seguidos por uma lavagem com água bidestilada e posteriormente com água ultra pura (MilliQ). As vidrarias foram aquecidas a 300 °C durante a noite para eliminação de matéria orgânica.

3.3.2. Água do mar artificial 4,0 Ga

A água do mar foi preparada pela dissolução em 1 L de água ultra pura dos seguintes sais: Na₂SO₄ (0,271 g), MgCl₂.6H₂O (0,500 g), CaCl₂.2H₂O (2,50 g), KBr (0,050 g), K₂SO₄ (0,400 g), e MgSO₄ (15,00 g) (Zaia, 2012). Soluções salinas de KCl, K₂SO₄, MgCl₂.6H₂O e MgSO₄ com concentração de 0,129 mol L⁻¹ foram preparadas de modo a entender o comportamento de cada sal. O valor da concentração (0,129 mol L⁻¹) é similar ao valor da concentração de sulfato (SO₄²⁻) na água do mar (4,0 Ga)

3.3.3. Preparo das amostras

Dois conjuntos de amostras foram preparados: **i)** Amostras sólidas secas foram obtidas através da liofilização de soluções de adenina ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) em água destilada e água do mar (4,0 Ga). As soluções foram congeladas em um refrigerador e posteriormente colocadas em um liofilizador à vácuo (alto vácuo, 50 mPa, $-50 \text{ }^\circ\text{C}$); **ii)** Soluções contendo adenina ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas em água destilada, soluções salinas e água do mar (4,0 Ga). As soluções foram borbulhadas com gás argônio (Ar), seladas e conduzidas ao reator de ^{60}Co .

3.3.4. Ensaio de irradiação

As amostras foram irradiadas com auxílio de uma fonte de raios gama (*Gammabeam 651-PT*) à temperatura ambiente (298K). A dose de irradiação foi determinada usando um dosímetro de sulfato ferroso-sulfato de cobre. A taxa de dose foi de 197 Gy min^{-1} . Doses de irradiação foram de 0 a 94,52 kGy.

3.3.5. Espectrofotometria UV-Vis

A absorvância de adenina foi determinada em um espectrofotômetro UV-Vis Varian modelo Cary 100 Scan. A quantidade de adenina foi determinada por leituras em 260 nm e 266 nm para soluções ácidas e alcalinas, respectivamente.

3.3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Adenina foi quantificada em um cromatógrafo equipado com um detector UV-Vis e uma coluna C-18. A fase móvel empregada foi de 77 % A (acetato de amônia $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado para 4,5 com ácido acético) e 23 % B (mistura de 250 mL de acetonitrila, 250 mL de metanol e 4 mL de tetrahydrofurano). A taxa de fluxo foi de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e a detecção realizada em 260 nm.

3.3.7. Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Os espectros FT-IR foram obtidos com um acessório de reflectância (*PerkinElmer spectrum 400*, USA). Os espectros foram adquiridos no modo transmitância de $650 \text{ a } 4000 \text{ cm}^{-1}$, e o número de varreduras foi de 10.

3.3.8. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos em um *WITec Confocal Raman Microscope System alpha 300*. Os espectros foram adquiridos com um laser em 785 nm, de 2000 a 370 cm^{-1} e com resolução de 4 cm^{-1} com 10 scans.

3.3.9. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

As amostras foram submetidas em um espectrômetro RPE (Jeol JES-TE300) do Instituto de Química, UNAM, operando na banda X, com 100 kHz de frequência de modulação e uma cavidade cilíndrica no modo TE011. O campo magnético recebeu calibração externa com um Jeol ES-FC5. As amostras foram colocadas em uma célula de quartzo (*flat-type*) e medidas em temperatura ambiente.

3.3.10. Análise Estatística

O teste Tukey foi realizado para analisar a quantidade de adenina em diferentes níveis de significância ($p < 0,05$).

3.3.11. Cálculos Computacionais

As geometrias moleculares foram otimizadas, as frequências e energias relativas (E_{rel}) foram calculadas usando o método da teoria de densidade funcional (DFT) através do funcional híbrido B3LYP (Becke, 1988; Becke, 1993; Lee, 1988), o conjunto de bases escolhido foi aug-cc-pVDZ (Dunning, 1998) pelo software *Gaussian 03* (Frisch, 2004). O conjunto de bases aug-cc-pVDZ foi escolhido em razão da correta descrição dos átomos de oxigênio e nitrogênio. O conjunto de bases inclui as funções difusas (prefixo aug-), em que é considerada a relativa natureza difusa dos pares isolados.

3.4. Resultados

3.4.1. Adenina sólida exposta à radiação gama

Da liofilização das soluções de adenina (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em água ultra pura e água do mar (4,0 Ga), amostras sólidas foram obtidas. Estes sólidos foram expostos à radiação gama na dose de 94,52 kGy. Os espectros Raman das amostras controle e irradiadas são mostradas na Figura 2. No espectro Raman do sólido irradiado obtido da liofilização de água destilada ocorre o desaparecimento de uma banda em 1467 cm^{-1} (Figura 2-a), atribuído ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ do anel pirimidínico, e uma pequena diminuição da intensidade da banda em 1312 cm^{-1} , atribuído

ao estiramento $\nu(\text{C-N})$ do anel pirimidínico (Anizelli *et al.*, 2014). Isso indica uma pequena decomposição de adenina, devido ao estado sólido da amostra, uma vez que a produção de radicais livres é maior em solução do que em sólidos. Deve ser salientado que a irradiação com raios X de adenina forma radical no nitrogênio N_3 , ligado ao carbono C_2 (Nelson *et al.*, 1992). Nenhuma mudança no espectro FT-IR é observada nos sólidos obtidos da liofilização em água destilada (Figura 2-c), o que indica a baixa decomposição de adenina quando em estado sólido.

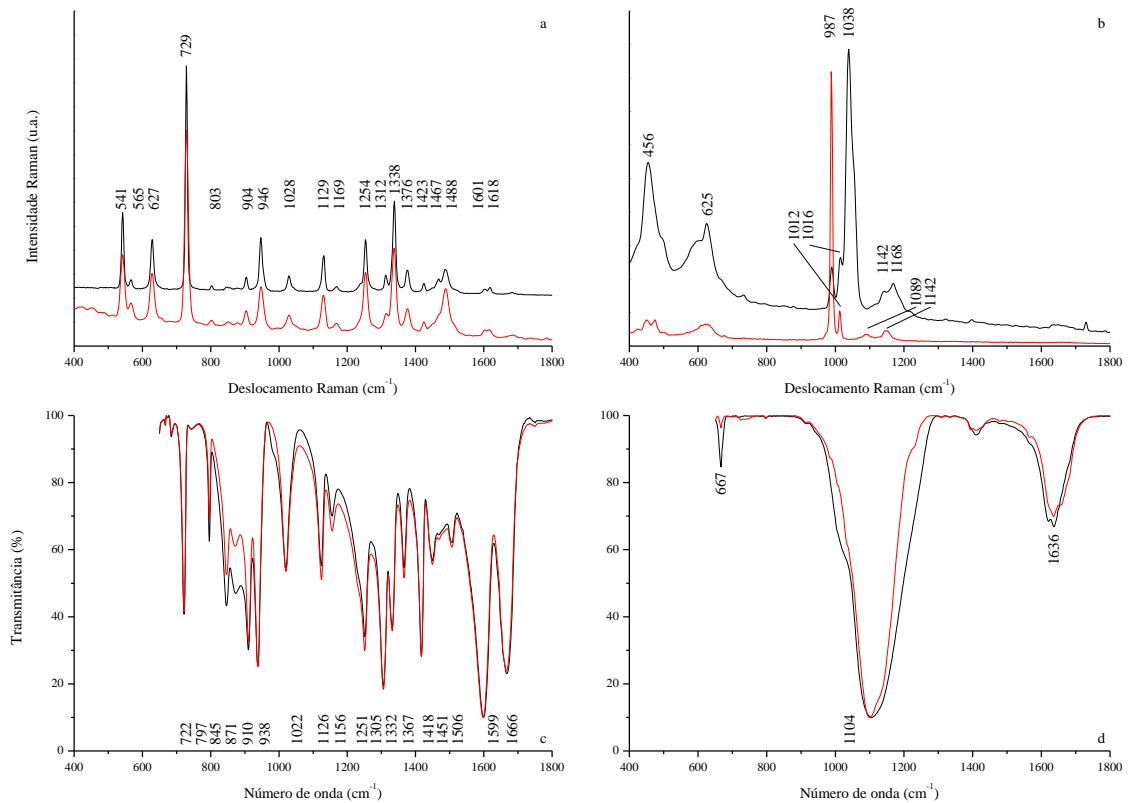


Figura 2. Amostras controles (*linha preta*) e amostras expostas à radiação gama com dose de 94,52 kGy (*linha vermelha*). Espectros obtidos da liofilização da solução de adenina ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) em água destilada: **a)** Raman; **c)** FT-IR. Espectros obtidos da liofilização da solução de adenina ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) em água do mar (4,0 Ga): **b)** Raman; **d)** FT-IR.

Mesmo procedimento foi realizado com as amostras obtidas da solução de adenina em água do mar (4,0 Ga). Contudo, nenhuma banda de adenina é observada, devido a menor concentração de adenina quando comparada com os sais da água do mar. O espectro FT-IR apresenta três bandas em 667, 1104 e 1636 cm^{-1} . A banda mais intensa em 1104 cm^{-1} é atribuída aos modos vibracionais ν_1 da espécie de sulfato (SO_4^{2-}) (Colthup *et al.*, 1990). A frequência em 1636 cm^{-1} é atribuída ao *bending* $\beta(\text{H-O-H})$, da hidratação dos sais (Ault, 1978). É observado uma pequena diminuição na intensidade da absorção da banda em 667 cm^{-1} , atribuída ao

bending $\beta(\text{SO}_4^{2-})$ do íon sulfato (SO_4^{2-}), devido a formação de sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). O mineral gesso possui mesma frequência de vibração no espectro FT-IR (Anbalagan *et al.*, 2009), assim como o sal sulfato de cálcio (CaSO_4) também tem (Miller e Wilkins, 1952). Não obstante, após exposição à radiação gama, esta frequência diminui de intensidade.

No espectro Raman observa-se um deslocamento de 1038 para 987 cm^{-1} quando após exposta à radiação gama. Esta banda na região 1020-1200 cm^{-1} é atribuída ao modo vibracional (ν_1) do íon sulfato (Colthup, 1990). Deste modo, o deslocamento dessa banda está relacionado à interação da radiação com o íon sulfato. Wang *et al.* (2006) observaram que o sal sulfato de magnésio desloca a frequência deste modo de vibração de acordo com a hidratação do sal. O sal anidro possui a frequência em 1022 cm^{-1} , enquanto que o sal hidratado ou em solução aquosa possui a frequência em 984 e 982 cm^{-1} , respectivamente. E a mudança da frequência deste modo vibracional é devido à mudança de simetria do íon sulfato (Nakamoto, 2009). Estes resultados sugerem uma interação da radiação gama com os sais presentes na água do mar, e não meramente interação com a molécula da base nitrogenada.

Além disso, a irradiação de espécies de sulfato promove defeitos como SO_4^- , SO_3^- , SO_2^- , O^- e O_3^- pela formação de um buraco eletrônico (*electron-hole*) (Nurakhmetov *et al.*, 2016), sendo SO_4^- o primeiro defeito produzido (Equação 1), em que é detectável por espectroscopia RPE (Gromov e Morton, 1966, Byberg, 1986).



Por outro lado, o íon sulfato (SO_4^{2-}) que absorve na região de 1020-1200 cm^{-1} , o íon sulfito (SO_3^{2-}) absorve na região 920-980 cm^{-1} (Colthup, 1990). Também, o espectro no infravermelho (FT-IR) do sal sulfato de cálcio (CaSO_4) possui uma banda intensa entre 1130-1010 cm^{-1} , e o sal sulfito de cálcio (CaSO_3) possui uma banda intensa entre 970-945 cm^{-1} (Miller e Wilkins, 1952). Portanto, pode-se enunciar duas hipóteses: **a**) através da exposição à radiação, o íon sulfato muda de simetria, e **b**) ocorre a formação de defeitos (buraco eletrônico) produzindo SO_3^- .

As amostras controles dos sólidos obtidos pela liofilização das soluções de adenina em água destilada e do mar não apresentam sinal RPE (Figura 3, amostras a, c). Por outro lado, as amostras expostas à radiação gama apresentam sinal RPE, o que indica a formação de radicais livres induzidos por radiação gama (Figura 3, amostras b, d). A amostra obtida a partir da solução de adenina em água destilada e posteriormente irradiada possui um sinal RPE com

$g \sim 2,004$, característico de um radical livre. Este radical pode ser devido à degradação de adenina. Conforme pontuado, a irradiação de adenina promove a formação de radicais, que são detectados por RPE espectroscopia (Nelson *et al.*, 1992). Zehner *et al.* (1976) descrevem a formação de radicais em derivados de adenina mediante irradiação com raios X, pela adição de um próton no carbono C_2 ou C_8 .

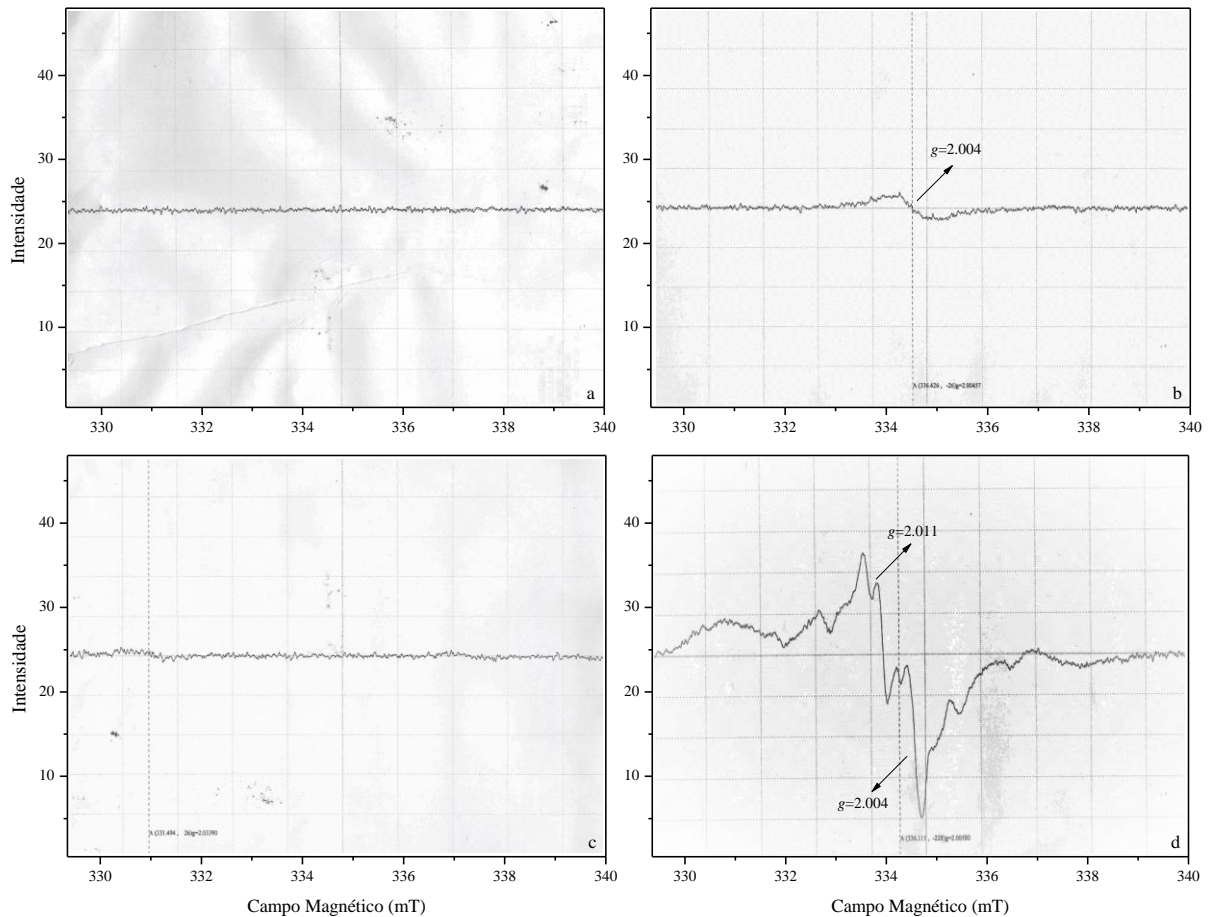
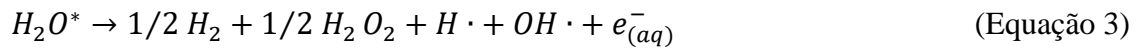


Figura 3. Espectros RPE dos sólidos obtidos da liofilização da solução de adenina ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) em: **a)** água destilada; **b)** água destilada e irradiado com dose de 94,52 kGy; **c)** água do mar (4,0 Ga); **d)** água do mar (4,0 Ga) e irradiado com dose de 94,52 kGy

No caso da amostra obtida a partir da solução irradiada de adenina em água do mar (4,0 Ga), várias linhas de ressonância no espectro são sobrepostas, o que dificulta a interpretação. Isto ocorre por causa da mistura dos sais (cátions e ânions) na amostra. Deve ser pontuado que os íons com maior concentração são SO_4^{2-} , Cl^- , Mg^{2+} e Ca^{2+} . Após irradiação, íons sulfatos podem gerar radicais livres que são detectados por espectroscopia RPE. Os sinais podem ser atribuídos aos radicais formados pela decomposição do ânion sulfato (Gromov e Morton, 1966, Byberg, 1986).

3.4.2. Adenina aquosa exposta à radiação gama

O radical $\bullet\text{OH}$ é a principal espécie formada pela radiólise da água (Equações 2-3) pela radiação ionizante (Samuel e Magee, 1953, Allen, 1961, Draganić and Draganić, 1971). O oxigênio dissolvido (O_2) pode mudar a principal espécie oxidante formada (Equação 4) (Draganić e Draganić, 1971). Para entender o comportamento de adenina aquosa exposta à radiação gama em quatro diferentes doses, ensaios com adenina aquosa em água destilada foram realizados com oxigênio (O_2) e argônio (Ar) dissolvidos, e também com soluções salinas e água do mar (4,0 Ga), mas estes sem oxigênio (O_2) dissolvido, removido via adição de gás argônio (Ar).



O valor de pH das soluções de adenina após irradiação foi medido (Figura 4). É observado uma tendência no aumento do valor de pH para as soluções após irradiação, mas não para adenina em solução salina de MgCl_2 e de água do mar (4,0 Ga). Mudanças no valor do pH são uma indicação de ocorrência de reações químicas.

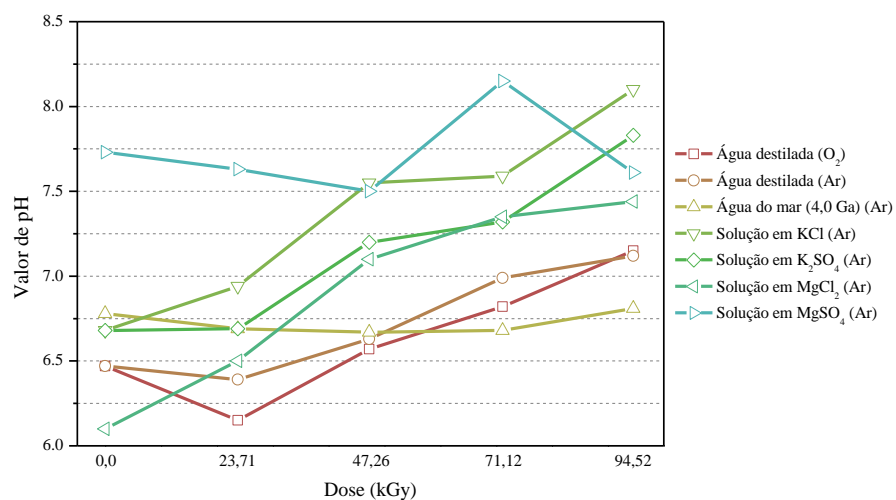


Figura 4. Valor de pH das soluções de adenina após irradiação.

O aumento no valor de pH pode ser devido: **i**) ao elétron hidratado que reage com o radical hidroxila, formando íon hidroxila (Equação 5) (Schmidt e Ander, 1969, Hata *et al.*, 2015); **ii**) liberação de íon amônio via degradação da adenina em seu grupo NH_2 (reação de deaminação, Ponnampereuma *et al.*, 1963). Deve ser notado que a irradiação das soluções resulta em uma coloração amarelada, outra indicação de reação química.

O espectro UV-Vis dessas amostras apresentaram uma pequena absorção na região entre 350 e 280 nm. É também notado que quanto maior a dose de radiação exposta, menor a intensidade da absorção da banda característica da adenina, em 260 nm (Figura 5). Isso implica na decomposição da adenina, e a quantidade da adenina remanescente foi quantificada por HPLC.

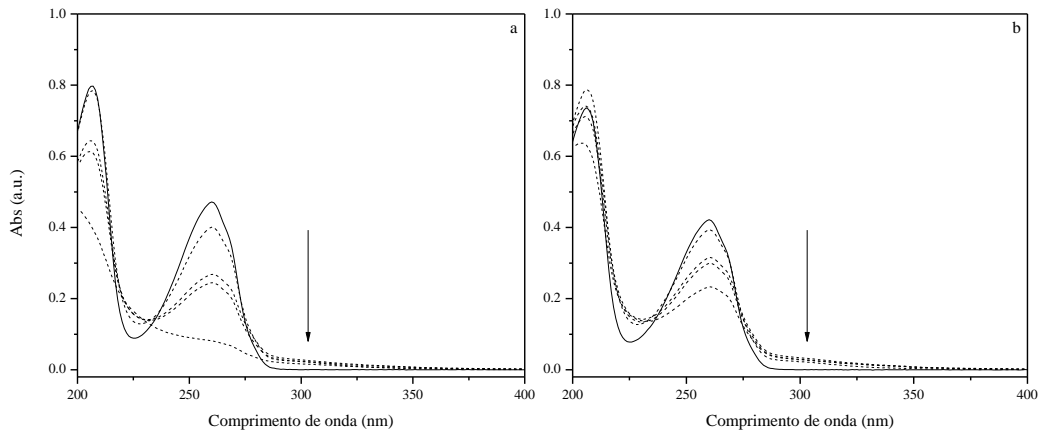


Figura 5. Espectros UV-Vis de adenina em: **a**) água destilada; **b**) água do mar (4,0 Ga). Espectros das soluções de adenina não irradiadas (*linha sólida*), e amostras irradiadas (*linhas tracejadas*).

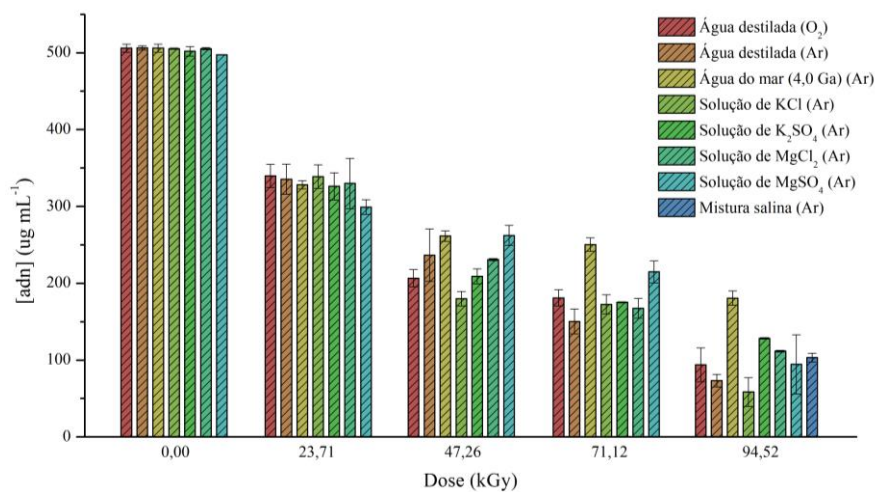


Figura 6. Concentração de adenina por dose de radiação gama. Os valores estão apresentados em forma de barras com média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm erro padrão da média.

Para as soluções salinas e em água do mar (4,0 Ga) de adenina, os cátions foram removidos usando uma resina de troca catiônica antes da injeção no cromatógrafo (HPLC). A figura 6 mostra a quantidade de adenina após quatro doses de irradiação (23,71, 47,26, 71,12 e 94,52 kGy). Análise estatística foi realizada e está descrita na tabela 1.

É observado que em 23,71 kGy não há diferença entre água destilada (com ou sem O₂ dissolvido), soluções salinas e água do mar (4.0 Ga). No entanto, em uma dose maior (47,26 kGy) é observado uma maior quantidade remanescente de adenina em água do mar (4,0 Ga) e uma menor quantidade em solução de KCl. A concentração remanescente de adenina na dose de 71,12 kGy em água do mar (4,0 Ga) é estatisticamente a mesma apenas para a da solução em MgSO₄ e estatisticamente diferente de todas outras soluções de adenina. Para a dose de 94,52 kGy, a quantidade restante de adenina em água do mar (4,0 Ga) é estatisticamente igual apenas para a da solução em K₂SO₄ e estatisticamente diferente de todas outras soluções de adenina. É importante ressaltar que as concentrações de adenina remanescente em água do mar (4,0 Ga) nas últimas maiores doses são estatisticamente iguais as das soluções de sulfato (Tabela 1), que é ânion mais abundante na solução de água do mar (4,0 Ga).

Tabela 1. Concentração de adenina por dose de radiação gama.

Solução de adenina	Dose (kGy)				
	0,00	23,71	47,26	71,12	94,52
Água Destilada (O ₂)	506,0 ± 5,3 a, A	339,7 ± 15,1 a, B	206,4 ± 11,2 a,b, C	181,0 ± 10,5 b,c, C	93,8 ± 22,0 b, D
Água Destilada (Ar)	506,3 ± 2,7 a, A	335,4 ± 19,5 a, B	236,5 ± 34,2 a,b, C	150,3 ± 16,1 c, D	73,3 ± 8,2 b, E
Água do mar (4,0 Ga) (Ar)	506,0 ± 5,3 a, A	328,1 ± 5,3 a, B	261,5 ± 6,7 a, C	250,4 ± 8,8 a, C	180,7 ± 9,1 a, D
Solução de KCl (Ar)	505,3 ± 0,7 a, A	338,7 ± 15,3 a, B	180,0 ± 9,4 b, C	172,4 ± 12,4 b,c, C	87,7 ± 18,5 b, D
Solução de K ₂ SO ₄ (Ar)	502,0 ± 6,1 a, A	326,2 ± 17,7 a, B	209,1 ± 9,8 a,b, C	144,0 ± 0,7 c, D	128,4 ± 1,0 a,b, D
Solução de MgCl ₂ (Ar)	505,3 ± 1,3 a, A	329,9 ± 32,7 a, B	230,8 ± 1,4 a,b, C	167,4 ± 12,9 b,c, D	111,7 ± 1,1 b, D
Solução de MgSO ₄ (Ar)	497,3 ± 0,3 a, A	299,1 ± 9,5 a, B	262,3 ± 12,9 a, B,C	214,9 ± 14,2 a,b, C	94,5 ± 38,6 b, D
Mistura Salina (Ar)	-	-	-	-	103,3 ± 5,7 B

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. O número de conjuntos foi de três. Foram irradiados 5 mL de adenina na concentração de 500 ug mL⁻¹, em diferentes doses de exposição à radiação gama. Letras maiúsculas nas linhas são estatisticamente diferentes entre si pelo teste Tukey (p < 0,05). Letras minúsculas nas colunas são estatisticamente diferentes entre si pelo teste Tukey (p < 0,05). A água do mar (4,0 Ga) usada foi preparada como descrito por Zaia (2012).

A concentração de adenina na mistura de solução salina de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e $MgSO_4$ não se apresentou estatisticamente diferente da concentração de adenina nas soluções de sais separados. Isso significa que a menor taxa de degradação de adenina em água do mar não depende apenas dos ânions cloreto e sulfato, por que este efeito só é observado quando todos os sais estão reunidos na solução de água do mar (4,0 Ga). A análise das soluções em diferentes doses da radiação gama mostrou que a concentração de adenina nas doses de 47,26 e 71,12 kGy são estatisticamente as mesmas, exceto para adenina em água destilada sem oxigênio dissolvido, água do mar e solução de KCl (Tabela 1). Todas outras doses são estatisticamente diferentes para todas soluções de adenina. Esses resultados sugerem que em meio de água do mar (4,0 Ga), adenina possui maior resiliência em se decompor quando comparado com água destilada e as soluções salinas.

3.4.3. Rendimento radioquímico

O rendimento radioquímico é definido como o número de espécies produzidas ou desaparecidas por 100 eV de radiação absorvida (Allen, 1961, Draganić e Draganić, 1971). Pode ser descrito pela equação 6, o rendimento radioquímico, G , é igual ao número de mols de adenina desaparecidos, n , multiplicado pelo número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$), dividido pela dose absorvida, Gy , multiplicada por um fator de conversão ($6,245 \times 10^{18}$) de gray (Gy) para elétron-volt (eV).

$$G = 100 \left(\frac{n \times (6,023 \times 10^{23})}{Gy \times (6,245 \times 10^{18})} \right) \quad (\text{Equação 6})$$

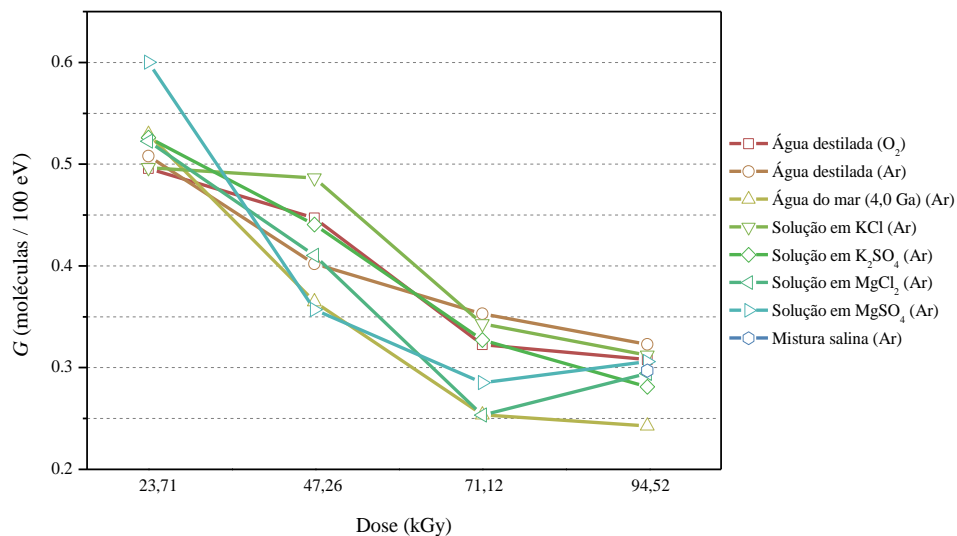


Figura 7. Rendimento radioquímico em função da dose. G é definido como o número de moléculas de adenina desaparecidas por 100 eV de radiação absorvida.

A Figura 7 mostra os valores de G para todos os experimentos em solução. Observa-se que o menor valor de G é obtido para solução de adenina em água do mar (4,0 Ga) para a maior dose (94,52 kGy). O baixo valor de G para decomposição de adenina sugere sua resiliência em decomposição em solução, e pode ser devido as reações de reconstituição, tendo como adenina seu produto (Van Hemmen e Bleichrodt, 1971).

3.4.4. Análise Vibracional

As amostras irradiadas foram liofilizadas e obtidos os espectros FT-IR. Em doses mais altas as moléculas são mais decompostas, e esse comportamento também é observado por espectroscopia no infravermelho (FT-IR). Pela diminuição da intensidade das bandas de adenina (Figura 8) observa-se a decomposição da molécula. Todas as bandas foram caracterizadas de acordo com Anizelli *et al.* (2014). É observado a diminuição da intensidade das bandas em 911 e 938 cm^{-1} (Figura 8), que são atribuídas à deformação $\delta(\text{C-N-C})_{py}$ do anel pirimidínico e deformação $\delta(\text{N-C=N})_{im}$ do anel imidazólico, respectivamente. As bandas em 1019 e 1123 cm^{-1} são atribuídos ao *rocking* $\rho(\text{NH}_2)$ e deformação $\delta(\text{C-H})_{im}$, respectivamente. Em 1251 cm^{-1} há o estiramento $\nu(\text{C-NH}_2)$ e em 1415 cm^{-1} a deformação $\delta(\text{C}_2\text{-H})_{py}$. As principais mudanças ocorrem em 1598 e 1668 cm^{-1} que são atribuídos ao estiramento $\nu(\text{C=C})$ e ao *bending* no plano $\beta(\text{NH}_2)$, respectivamente. Nessa região há a formação de novas bandas. É inferido que a irradiação gama afeta por toda a molécula de adenina, pelos anéis pirimidínico e imidazólico.

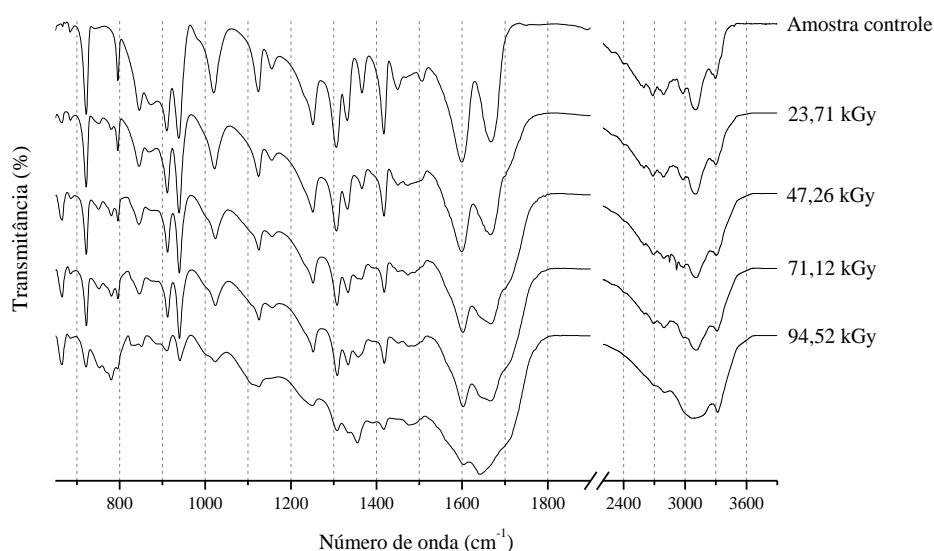


Figura 8. Espectro no infravermelho (FT-IR) dos sólidos obtidos da liofilização da solução de adenina ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) sem O_2 dissolvido.

Para entender as novas bandas e ombros formados, foi realizado a deconvolução (Figura 9) do espectro FT-IR da amostra de adenina controle e submetida a dose de 71,12 kGy (sem O₂ dissolvido). O espectro FT-IR do controle de adenina apresenta duas bandas principais na região de 1550 a 1750 cm⁻¹. No entanto, essas bandas são formadas por outros modos vibracionais. Foi realizada a deconvolução dessas duas bandas e a melhor regressão apresentou quatro bandas (Figura 9). As bandas obtidas ocorrem em 1572, 1603, 1650 e 1674 cm⁻¹, e são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}=\text{N})$ e ao *bending* no plano $\beta(\text{NH}_2)$, respectivamente (Anizelli *et al.*, 2014).

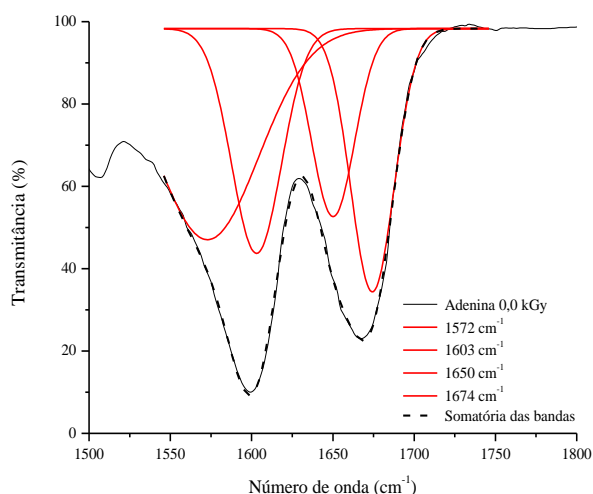


Figura 9. Deconvolução das bandas na região de 1550 até 1750 cm⁻¹ no espectro FT-IR do sólido obtido da liofilização da solução de adenina. A melhor regressão foi obtida com quatro bandas ($R^2=0,998$).

Para a amostra irradiada com dose de 47,26 kGy com oxigênio dissolvido são observadas bandas deslocadas em 1585, 1600, 1641 e 1668 cm⁻¹, e uma nova banda em 1711 cm⁻¹ (Figura 10-A). Para a amostra irradiada com a dose de 71,12 kGy sem oxigênio dissolvido é observado um deslocamento em 1600, 1602, 1640 e 1668 cm⁻¹ e uma nova banda em 1713 cm⁻¹ (Figura 10-B). Estas novas bandas (1711 e 1713 cm⁻¹) indicam que há a formação de uma nova banda ou interação na molécula de adenina. Adenina em solução ácida ($pK_{a1}=4,20$) torna-se protonada no nitrogênio N₁ do anel pirimidínico. A protonação leva ao deslocamento da banda em 1674 para 1699 cm⁻¹ no espectro vibracional (Anizelli *et al.*, 2014). Portanto, um dos produtos de decomposição de adenina deve ter esta nova banda no nitrogênio N₁.

No espectro FT-IR dos sólidos obtidos da liofilização de adenina em água do mar (4,0 Ga) após irradiação não é observado as bandas relativas à adenina, devido a intensa absorção das bandas relativas aos modos vibracionais dos sais hidratados (Figura 11).

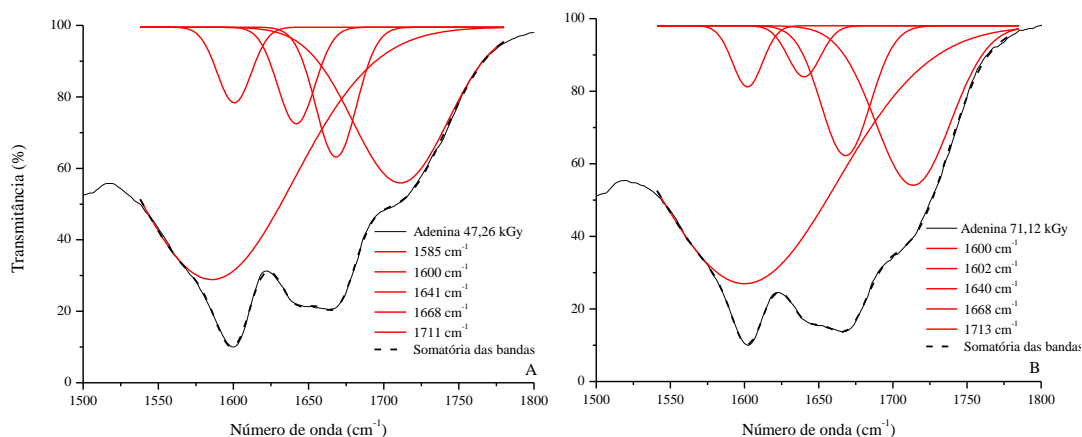


Figura 10. Deconvolução das bandas na região de 1550 até 1750 cm^{-1} do espectro FT-IR dos sólidos obtidos da liofilização da solução de adenina: **A)** com oxigênio (O_2) dissolvido e irradiado com dose de 47,26 kGy. A melhor regressão foi obtida com 5 bandas ($R^2=0,999$); **B)** sem oxigênio (O_2) dissolvido e irradiado com dose de 71,12 kGy. A melhor regressão foi obtida com 5 bandas ($R^2=0,999$).

As três bandas de alta intensidade em 1103, 1628 e 3385 cm^{-1} são atribuídas aos íons sulfato (SO_4), *bending* $\beta(\text{H-O-H})$ e ao estiramento $\nu(\text{O-H})$, respectivamente (Ferraro e Waler, 1965; Ault, 1978).

A amostra controle apresenta uma banda em 667 cm^{-1} que pode ser atribuída ao *bending* SO do íon sulfato (SO_4^{2-}) presente no mineral gesso (Iishi, 1979, Anbalagan *et al.*, 2009), e também é encontrado no espectro do sal sulfato de cálcio (Miller e Wilkins, 1952). A composição do gesso é o sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), que pode ser formado a partir dos íons presentes na água do mar (4,0 Ga) quando se é adicionado o mineral montmorillonita no sistema (Este ensaio é explorado no capítulo 4).

No entanto, após a irradiação, a banda em 667 cm^{-1} não aparece. Quanto ao desaparecimento desta banda, comportamento similar foi observado para os ensaios de irradiação em estado sólido. A formação do gesso ocorre após a liofilização da solução de adenina (amostra controle). Assim, após a irradiação este modo vibracional não é mais observado.

Portanto, os resultados sugerem que a interação dos radicais livres provenientes da irradiação das amostras com os íons sulfatos presentes na água do mar. Ou seja, supõe-se uma competição da adenina com os íons salinos pelos radicais formados. Isso diminuiria a decomposição da adenina.

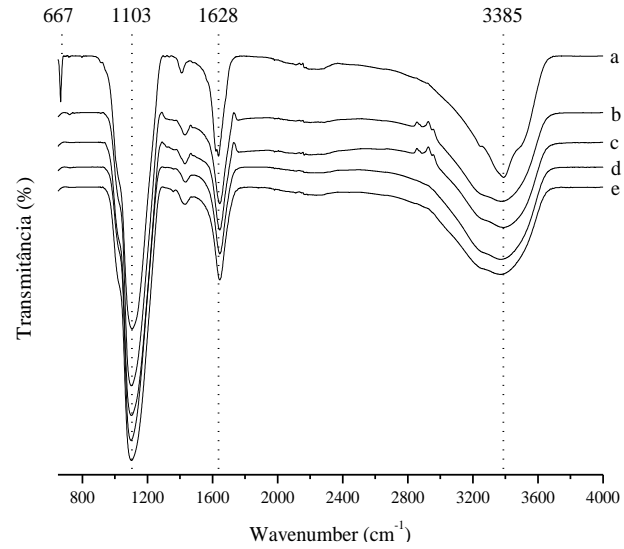


Figura 11. Espectro FT-IR dos sólidos obtidos da liofilização de adenina em água do mar (4,0 Ga): **a)** amostra controle, e amostras irradiadas com dose de: **b)** 23,71 kGy; **c)** 47,26 kGy; **d)** 71,12 kGy; **e)** 94,52 kGy.

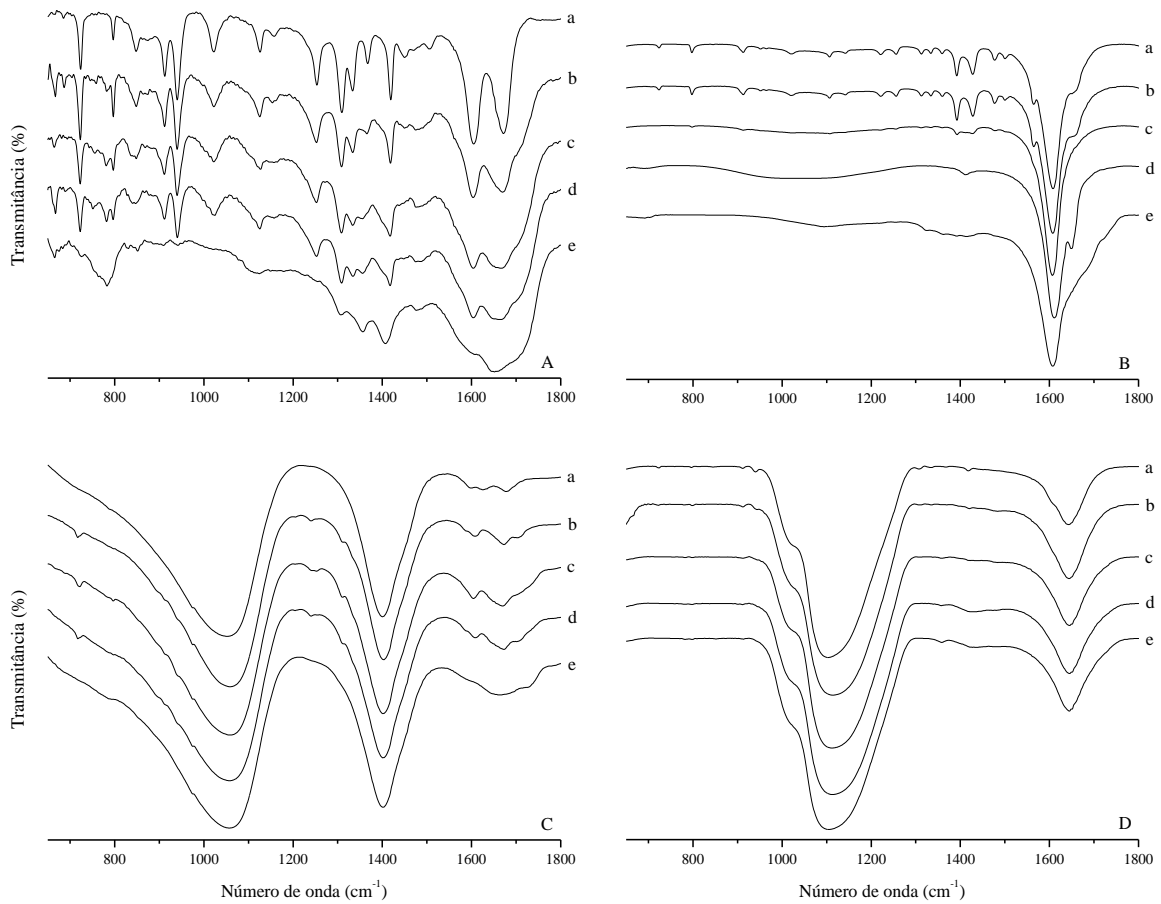


Figura 12. Espectros FT-IR obtidos da liofilização das soluções de adenina em: **A)** KCl; **B)** $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; **C)** K_2SO_4 ; **D)** $MgSO_4$. Espectro de: **a)** amostra controle, e irradiadas nas doses: **b)** 23,71 kGy; **c)** 47,26 kGy; **d)** 71,12 kGy; **e)** 94,52 kGy.

Com relação aos ensaios com soluções salinas, após irradiação as amostras foram congeladas, liofilizadas e obtidos os espectros FT-IR (Figura 12). É observado o mesmo comportamento que em água destilada. As bandas relativas à adenina diminuem de intensidade, e são formadas novas bandas na região de 1500 a 1800 cm^{-1} . No entanto, isso é observado apenas para as amostras em soluções em KCl e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Figura 12-A, B). Pois, para as amostras obtidas a partir das soluções de adenina em K_2SO_4 e MgSO_4 (Figura 12-C, D) são observados apenas as bandas relativas aos sais hidratados.

3.4.5. Caracterização dos produtos de decomposição

A irradiação de adenina aquosa produz um novo composto. Para testar as possíveis formações de xantina e hipoxantina (bases similares à adenina), padrões foram injetados no HPLC e diferentes tempos de retenção foram obtidos, os quais não correspondem ao novo composto. O pico relativo ao composto desconhecido aparece perto do pico da adenina, com menos de 0,5 minutos de diferença (Figura 13). Este comportamento sugere uma estrutura similar com a adenina.

É importante ressaltar que a quantidade do novo composto não é ampliada com o aumento da dose. Em vez disso, a área do pico diminui na dose de 94,52 kGy. Para determinar qual é o composto, as amostras foram injetadas em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas (HPLC-MS). Realizou-se a análise de modo a detectar os sinais m/z no modo positivo para adenina, hipoxantina e xantina. Nos ensaios com HPLC-MS, o tempo de retenção da hipoxantina, xantina e adenina foi de 1,84, 1,83 e 2,10, respectivamente. Assim, foi possível diferenciar adenina dos outros dois compostos, pelo tempo de retenção (Figura 14).

O espectro de massas do composto hipoxantina possui um pico de maior intensidade em 137 m/z , xantina em um pico e 153 m/z , e adenina possui dois picos em 136 e 137 m/z como intensidade similares (Figura 15).

Os compostos N_x -óxidos de adenina (Yamamoto, 1980) e 8-hidroxiadenina (Van Hemmen e Bleichrodt, 1971), alguns dos produtos da radiólise de adenina, possuem a massa de 151 unidades atômicas. No entanto, não foram injetados uma vez que não estavam disponíveis. Portanto, os cromatogramas dos padrões foram divididos em canais com os picos e 136, 137, 152 e 153 m/z (Figura 16) e usados como referências para comparar com os resultados obtidos da adenina aquosa exposta à radiação gama.

Nos cromatogramas obtidos das soluções de adenina após irradiação são observados que quanto maior o tempo de exposição, menor a área do pico de adenina (Figura 17). Isso demonstra que adenina é decomposto pela radiação ionizante, o que está de acordo com a análise prévia por HPLC.

Após divididos em quatro canais, são observados picos em 136 e 137 m/z, que são similares em área, mesmo comportamento da adenina. Além disso, as amostras apresentam um pequeno pico em 152 e 153 m/z, com tempo de retenção variando entre 2,01 e 2,07 minutos (Figura 18). Esses sinais podem ser relativos aos compostos xantina, N_x-óxidos de adenina ou hidroxadenina. Xantina possui tempo de retenção de 1,83 min, portanto, pode-se assumir que xantina não é um dos produtos formados.

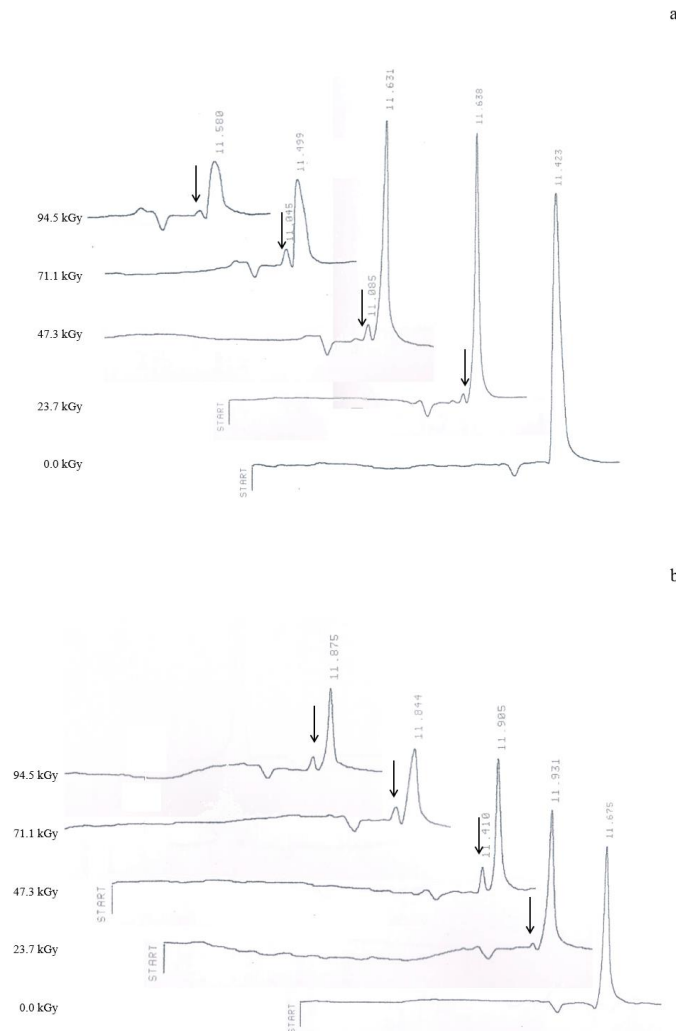


Figura 13. Cromatogramas das soluções de adenina em: **a)** água destilada; **b)** água do mar (4,0 Ga). Curva analítica (Anexo II).

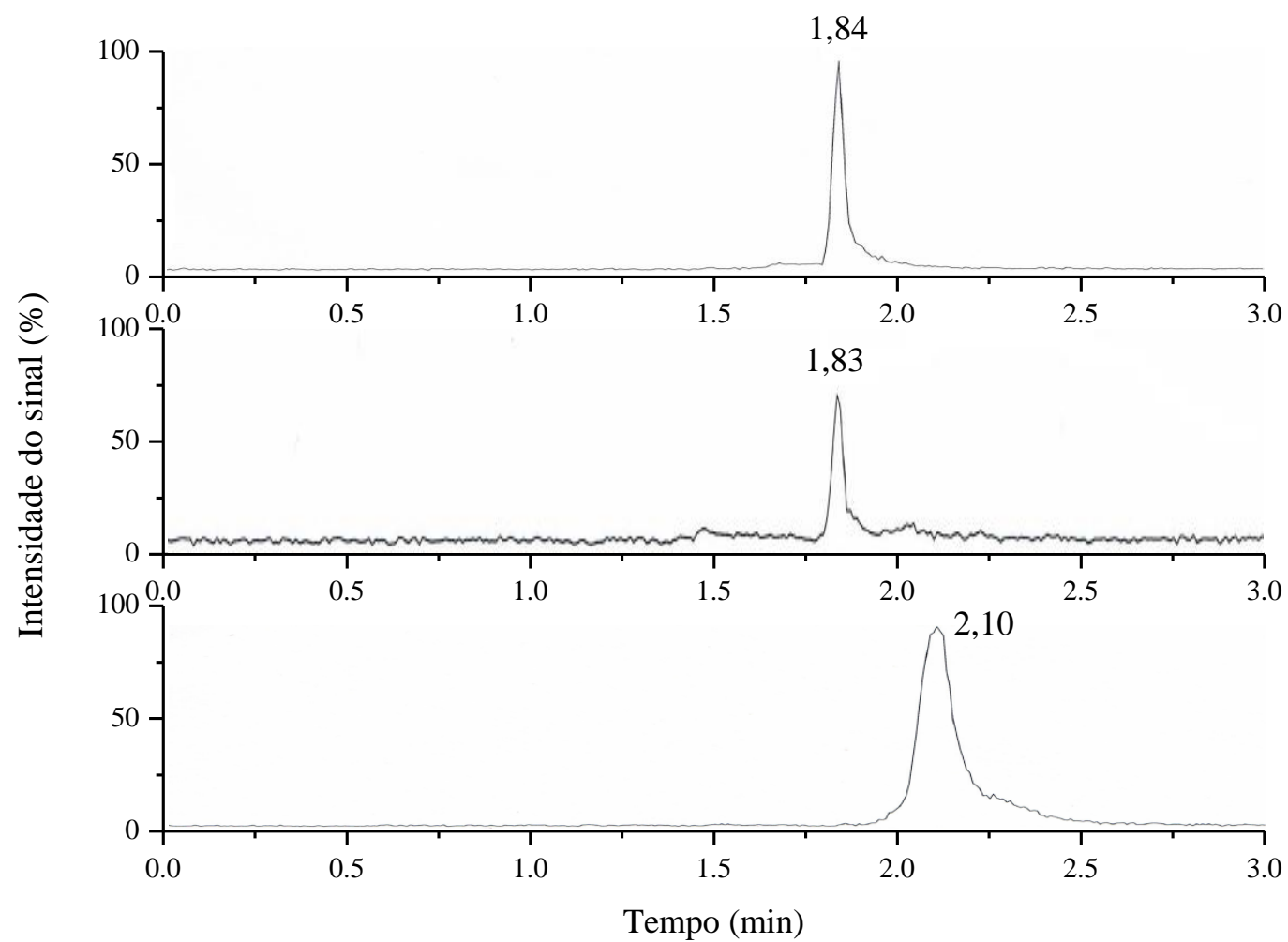


Figura 14. Cromatogramas no HPLC-MS das soluções de: **a)** hipoxantina; **b)** xantina; **c)** adenina.

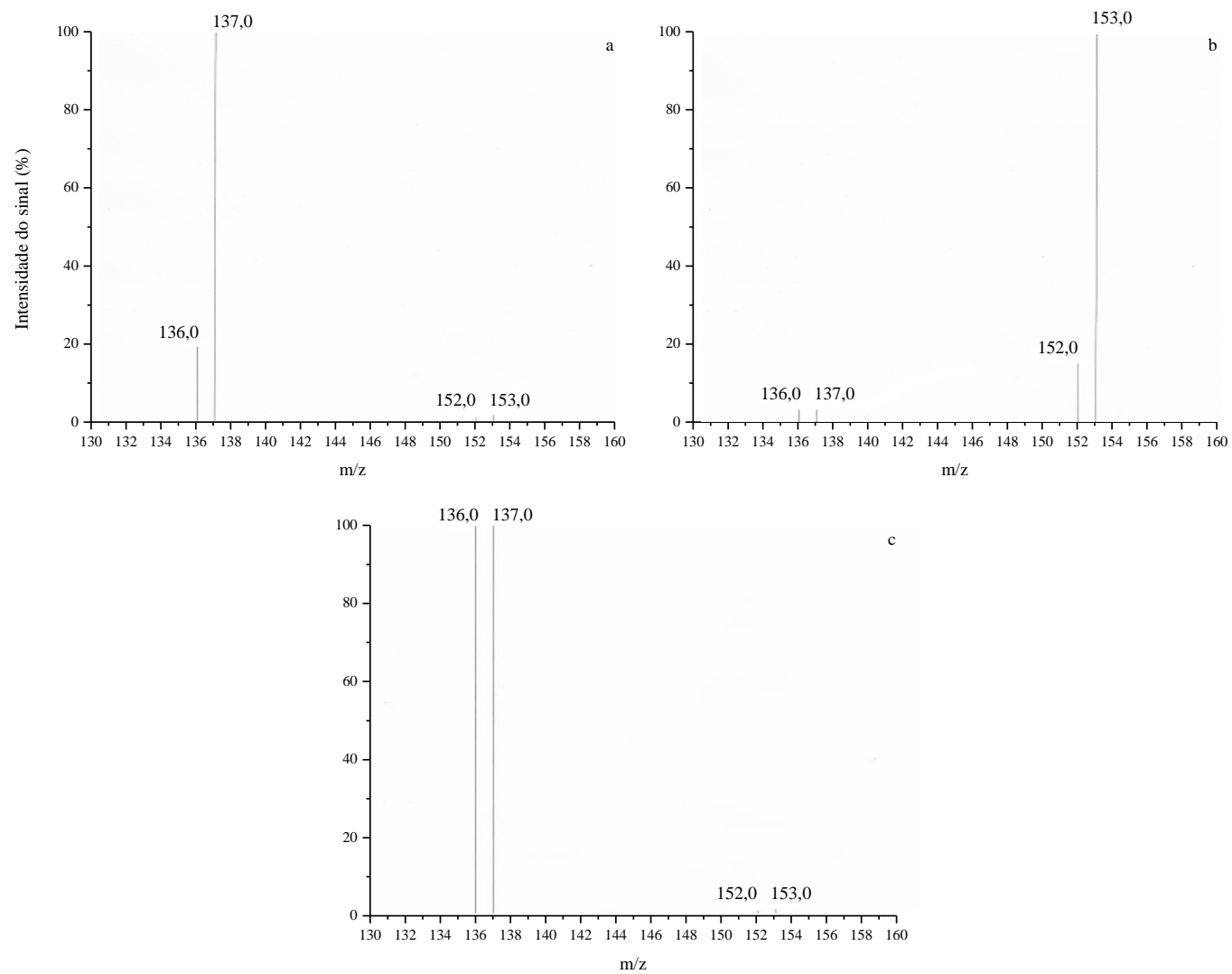


Figura 15. Espectro de massas dos padrões de: **a)** hipoxantina; **b)** xantina; **c)** adenina.

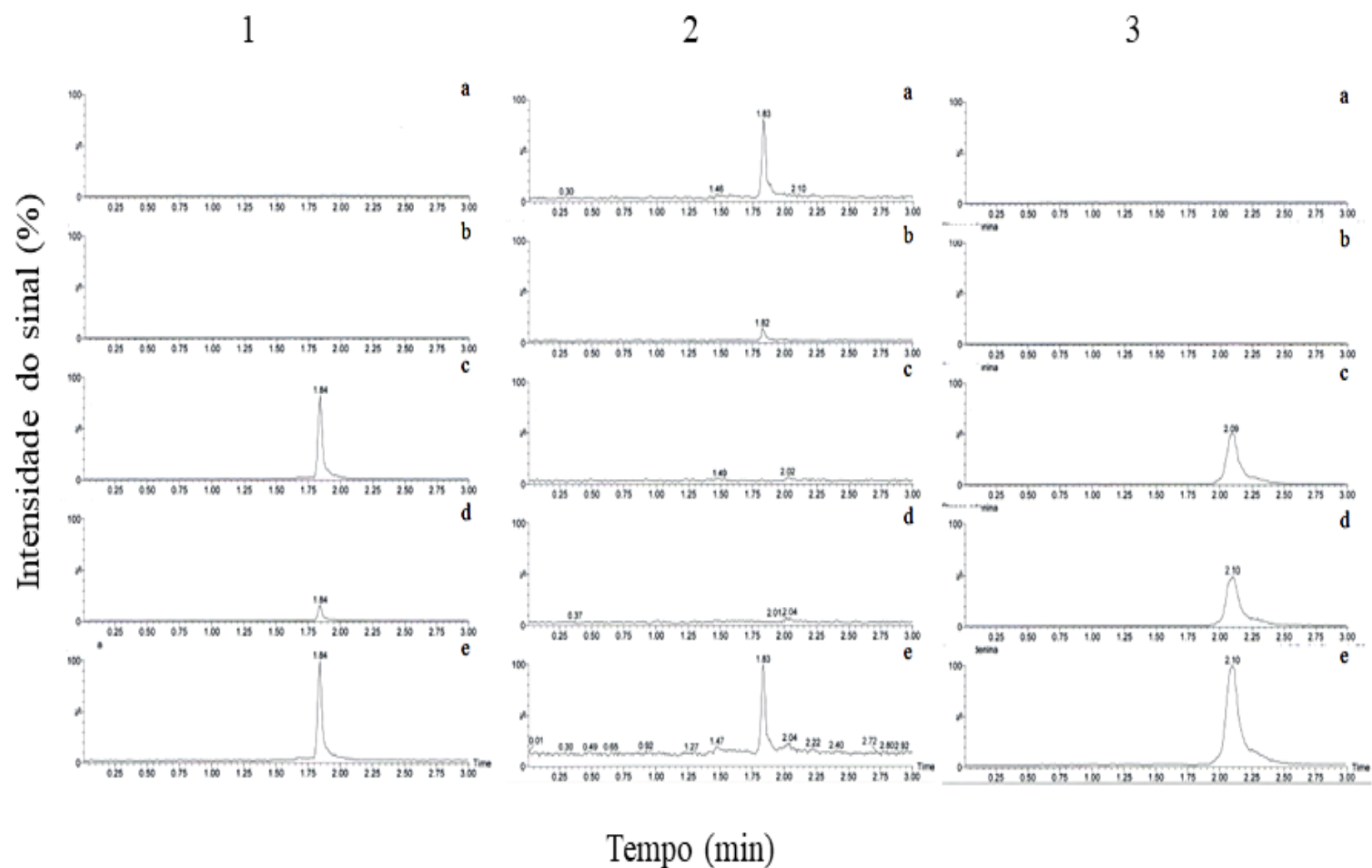


Figura 16. Cromatogramas (HPLC-MS) de: **1)** hipoxantina; **2)** xantina; **3)** adenina. Canais nos picos m/z: **a)** 153; **b)** 152; **c)** 137; **d)** 136; **e)** somatória de todos.

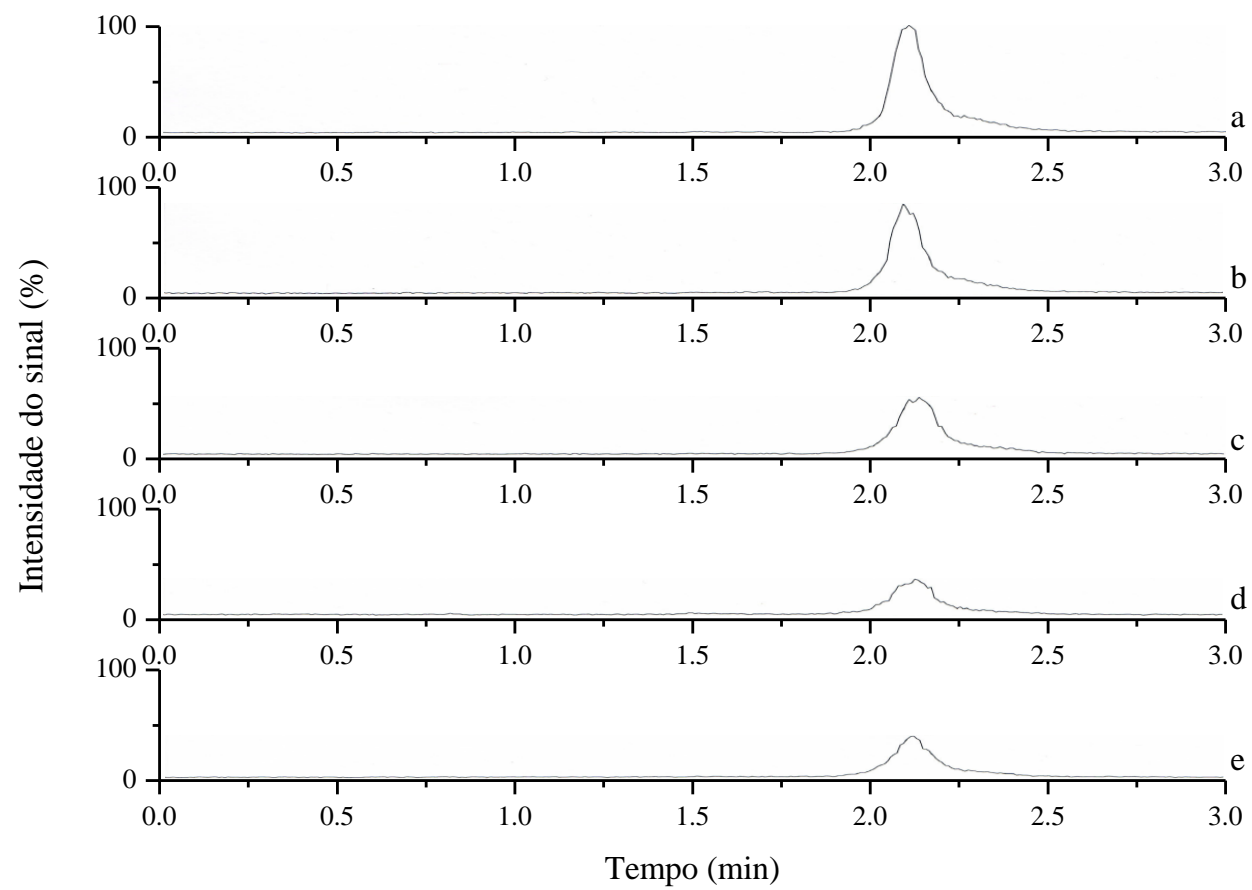


Figura 17. Cromatogramas (HPLC-MS) das soluções de adenina: **a)** amostra controle, e irradiadas nas doses: **b)** 23,71 kGy; **c)** 47,26 kGy; **d)** 71,12 kGy; **e)** 94,52 kGy.

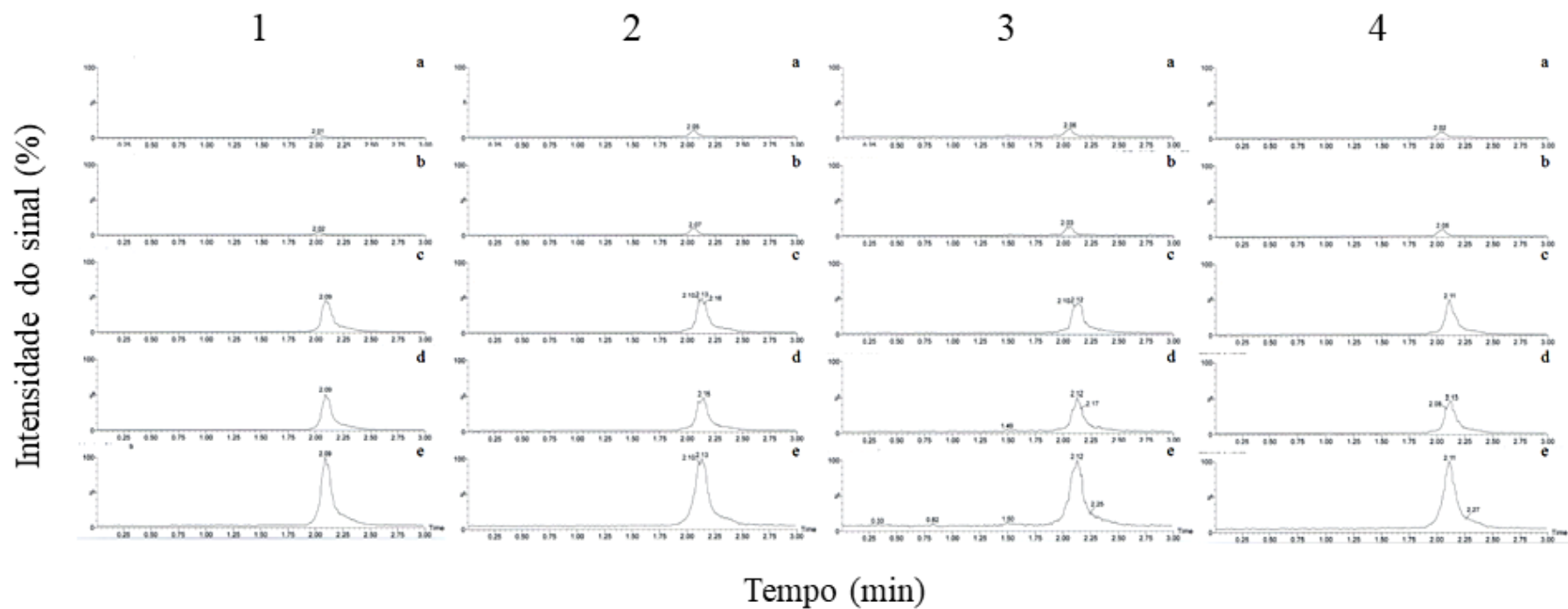


Figura 18. Cromatogramas (HPLC-MS) das soluções de adenina exposta à radiação gama nas doses de: **1)** 23,71 kGy; **2)** 47,26 kGy; **3)** 71,12 kGy; **4)** 94,52 kGy. Canais nos picos m/z: **a)** 153; **b)** 152; **c)** 137; **d)** 136; **e)** somatória de todos.

3.4.6. Cálculos Teóricos

A fim de investigar os possíveis produtos de decomposição da adenina irradiada, realizam-se cálculos teóricos. Figura 19 mostra a estrutura otimizada das moléculas simuladas. Os cálculos teóricos da molécula de adenina foram descritos por Anizelli *et al.* (2014), deste modo, usados como referência para comparação com os novos cálculos aqui descritos.

Otimizaram-se as geometrias (Figura 19) de três N_x-óxidos de adenina (N₁, N₃ e N₇-óxidos), 2-hidroxiadenina (enol-amino e ceto-amino), 8-hidroxiadenina (enol-amino e ceto-amino) e N-hidroxiadenina (6-N-hidroxol-aminopurina). Deve ser pontuado que algumas dessas espécies foram detectadas em experimentos com adenina exposta à radiação gama (Conlay, 1963, Ponnampuruma *et al.*, 1963, Van Hemmen e Bleichrodt, 1971, Yamamoto, 1980; Yamamoto e Fuji, 1986). Essas moléculas possuem massa molecular de 151 unidades atômicas, mesmo valor detectado pela espectrometria de massas (HPLC-MS). A geometria das moléculas foi otimizada através do funcional *B3LYP* e pelo conjunto de bases *aug-cc-pvdz*, e também simulado o espectro vibracional. Existem vários N_x-óxidos de adenina possíveis, mas apenas três são os mais recorrentes, com o oxigênio ligado aos nitrogênios N₁, N₃ e N₇ da adenina (Stevens, 1958a). Para as espécies de hidroxiadenina, existem vários tautômeros, amino, imínio, enol e ceto, mas apenas aquelas com menor energia relativa foram escolhidos para investigações (Cysewski *et al.*, 1995). As frequências das moléculas simuladas estão apresentadas na tabela 2.

Para adenina, as principais frequências simuladas foram 1513, 1600, 1636 e 1660 cm⁻¹, e são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{C}=\text{N})_{im}$, $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}=\text{N})$ e *bending* no plano $\beta(\text{NH}_2)$, respectivamente (Anizelli *et al.*, 2014). A tabela 2 apresenta as frequências simuladas dos N_x-óxidos de adenina e hidroxiadenina. As atribuições dessas frequências foram realizadas de acordo com os cálculos teóricos. É importante salientar que o N₁-óxido de adenina apresenta uma frequência em 1702 cm⁻¹. Esta frequência possui valor próximo a da nova banda observada na deconvolução do espectro FT-IR da amostra irradiada (Figura 10). Deve ser notado que os N₃ e N₇-óxidos de adenina possuem os mesmos modos vibracionais, mas em números de onda menores (1673 e 1687 cm⁻¹, respectivamente). As espécies ceto-amino apresentam frequências em 1746 e 1811 cm⁻¹ para 2-hidroxi-adenina e 8-hidroxi-adenina, respectivamente, que são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{C}=\text{O})$. Essas frequências não são observadas experimentalmente, portanto, pode ser assumido que os tautômeros ceto-amino não são formados.

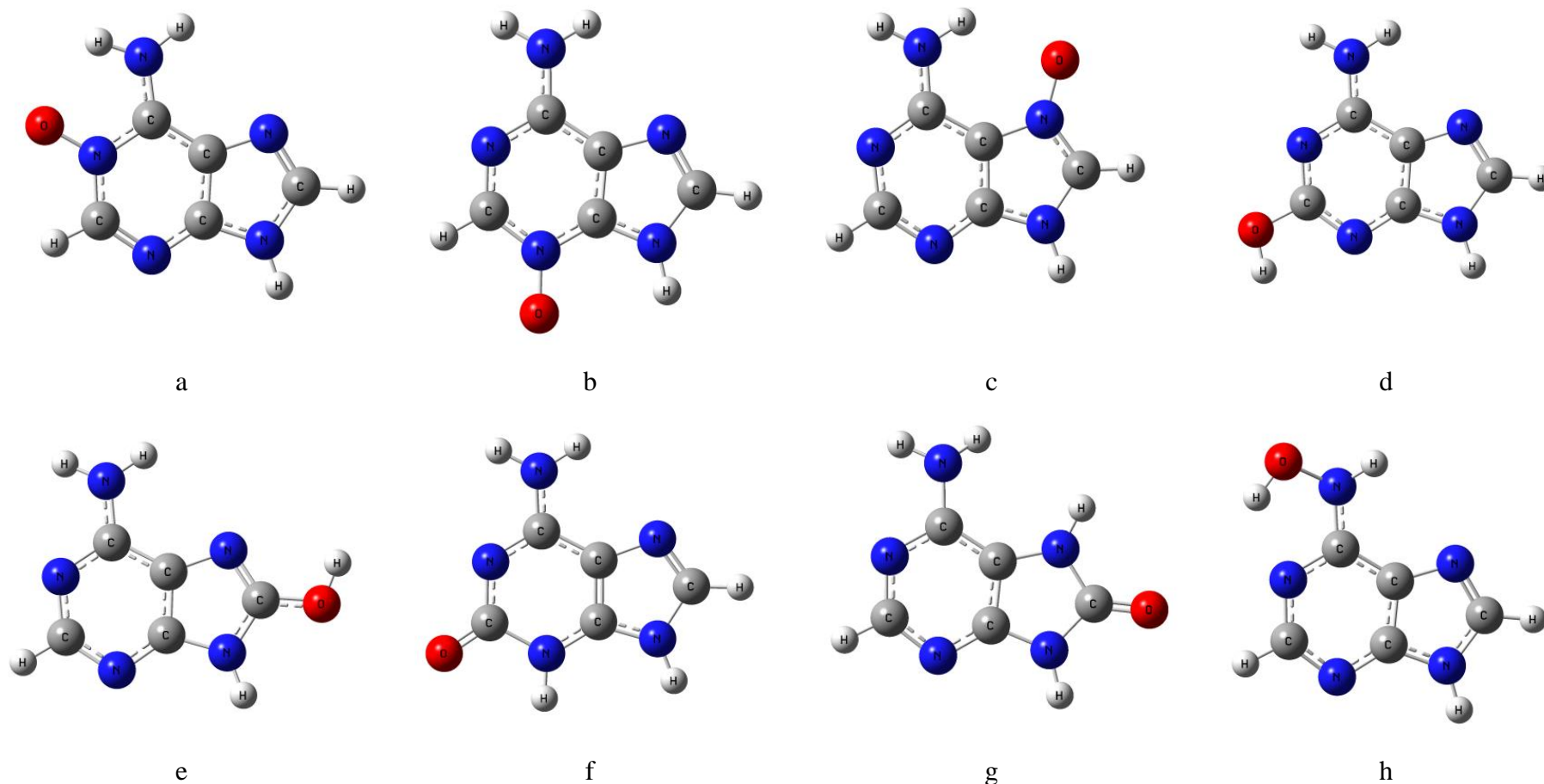


Figura 19. Representação tridimensional das estruturas otimizadas das moléculas calculadas: **a)** N₁-óxido de adenina; **b)** N₃-óxido de adenina; **c)** N₇-óxido de adenina; **d)** 2-hidroxiadenina (enol-amino); **e)** 8-hidroxiadenina (enol-amino); **f)** 2-hidroxiadenina (ceto-amino); **g)** 8-hidroxiadenina (ceto-amino); **h)** N-hidroxiadenina.

Figura 20 apresenta o diagrama de energia relativa (E_{rel}) das moléculas livres. Os compostos hidrox adenina e N_x -óxidos de adenina possuem menor energia relativa que a molécula de adenina. Para os N_x -óxidos de adenina, a molécula N_1 -óxido de adenina possui a menor energia relativa (E_{rel}) com pequena diferença em kcal mol⁻¹, pela sequência $N_1 < N_7 < N_3$. Os cálculos para hidrox adenina possuem menores valores de energia relativa (E_{rel}) que os N_x -óxidos de adenina. As energias relativas das espécies cetó-amino são menores que as espécies enol-amino (Figura 20). No entanto, como as frequências vibracionais calculadas das espécies enol-amino não estão de acordo com dados experimentais, conclui-se que não ocorre a formação destes.

Tabela 2 – Atribuição por tentativa das frequências observadas das moléculas simuladas.

Padrão		N_x -óxidos de adenina			
Adenina	Atribuição	N_1 -óxido de adenina	N_3 -óxido de adenina	N_7 -óxido de adenina	Atribuição
1660	$\beta(NH_2)$	1702	1673	1687	$\beta(NH_2)$
1636	$\nu(C=N)$	1627	1643	1632	$\nu(C=N)$
1605	$\nu(C=C)$	1565	1612	1600	$\nu(C=C)$
1513	$\nu(C=N)_{im}$	1525	1509	1550	$\nu(C=N)_{im}$
-	-	1294	1301	1266	$\nu(N-O)$

Enol-Amino		Ceto-Amino		Hidroxiaminopurina		
2-Hidroxi adenina	8-Hidroxi adenina	2-Hidroxi adenina	8-Hidroxi adenina	Atribuição	N-Hidroxi adenina	Atribuição
-	-	1746	1811	$\nu(C=O)$	-	-
1664	1666	1683	1677	$\beta(NH_2)$	1650	$\nu(C=C)$
1653	1648	1633	1644	$\nu(C=N)$	1629	$\nu(C=N)$
1614	1612	1596	1619	$\nu(C=C)$	1554	$\beta(HNOH)$
1523	1590	1524	1492	$\nu(C=N)_{im}$	1506	$\nu(C=N)_{im}$
1470	1534	-	-	$\beta(C-OH)$	1145	$\nu(N-O)$

ν , estiramento; β , *bending* no plano; im, anel imidazólico.

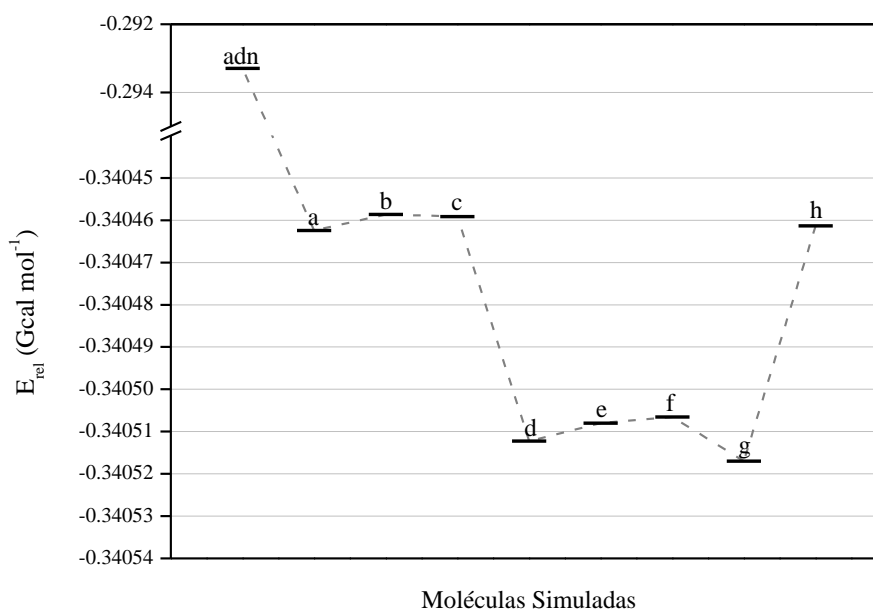


Figura 20. Diagrama de Energia Relativa (E_{rel}) (Gcal mol⁻¹) das moléculas simuladas: **adn**) adenina; **a**) N₁-óxido de adenina; **b**) N₃-óxido de adenina; **c**) N₇-óxido de adenina; **d**) 2-hidroxiadenina (enol-amino); **e**) 8-hidroxiadenina (enol-amino); **f**) 2-hidroxiadenina (ceto-amino); **g**) 8-hidroxiadenina (ceto-amino); **h**) N-hidroxiadenina.

3.5. Discussão

3.5.1. Radicais derivados de adenina

A exposição de adenina em solução aquosa à radiação ionizante e/ou radicais hidroxilas gera uma variedade de produtos como hipoxantina, xantina, 2-hidroxiadenina (isoguanina), 8-hidroxiadenina, 6-N-hidroxiadenina, N_x-óxidos de adenina, a própria adenina e outras espécies de anel aberto (Conlay, 1963, Ponnampertuma *et al.*, 1963, Rhaese, 1968, Van Hemmen e Bleichrodt, 1971, Yamamoto, 1980: Yamamoto e Fuji, 1986, Hartmann, *et al.*, 2007, Su *et al.*, 2011). A Figura 21 apresenta algumas reações propostas neste trabalho, baseado nos dados adquiridos e na literatura analisada. Equações 7 e 9 apresentam as reações de formação dos N₁ e N₇-óxidos de adenina. Deve ser notado que N₃-óxido de adenina possui maior energia relativa entre os N_x-óxidos de adenina. Cálculos teóricos resultaram na menor energia do N₁-óxido de adenina, sugerindo na formação deste. Nenhum trabalho prévio publicado detectou a formação de N₃-óxido de adenina. Yamamoto (1980) reporta a formação de N₇-óxido de adenina e sua conversão para N₁-óxido de adenina (Equação 8). N_x-óxidos de adenina são estáveis em solução aquosa e não são observados qualquer conversão para adenina por perda átomo de hidrogênio (Stevens *et al.*, 1958b).

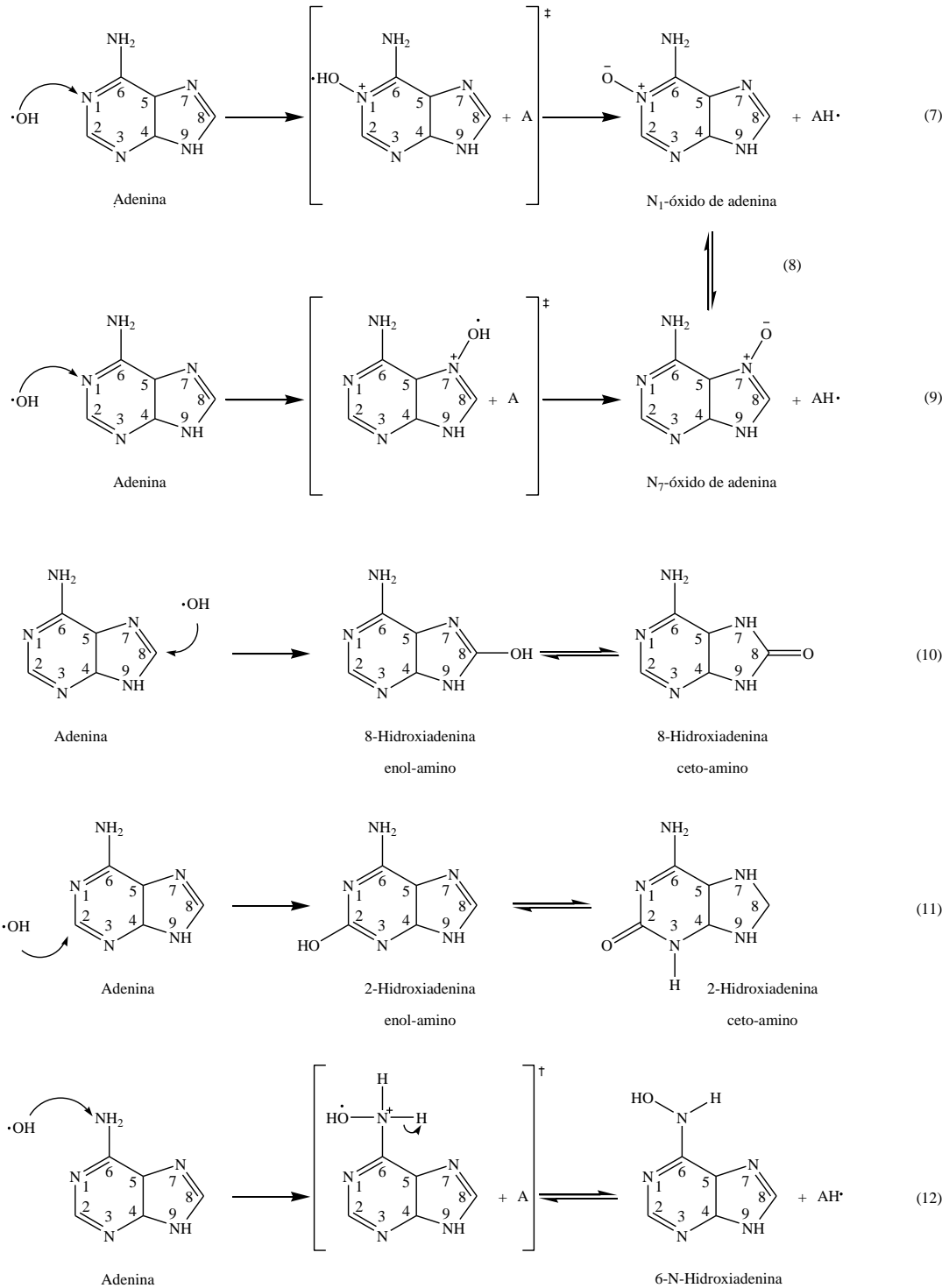


Figura 12. Mecanismos de reação para a irradiação de adenina aquosa. Passos em bráquetes se referem a estados de transição. (A Adenina; \bullet radical).

Equações 10 a 12 apresentam a formação de 2-hidroxiadenina, 8-hidroxiadenina e N-hidroxiadenina, respectivamente. A molécula 8-hidroxiadenina é o maior produto formado pela irradiação de solução de adenina (desareada), seguido por hipoxantina (Conlay, 1963), mas N_x -óxidos de adenina não são observados. A irradiação, promovida por Ponnampertuma *et al.*,

(1963), levou a formação de 8-hidroxiadenina e 4,6-diamino-5-formamidopirimidina com traços de hipoxantina e 4-amino-5-formamido-6-hidroxipirimidina. Van Hemmen e Bleichrodt (1971) observaram a formação de seis compostos, sendo o majoritário 8-hidroxiadenina pela exposição de adenina aquosa pela radiação gama (desareada). Por outro lado, a exposição pela radiação X de adenina aquosa promove a formação de vários produtos, como N₁-óxido de adenina, N₇-óxido de adenina, 8-hidroxiadenina, 2-hidroxiadenina e outros (Rhaese, 1968). A irradiação gama de solução aquosa de adenina também produz N₁-óxido de adenina, N₇-óxido de adenina, 2-hidroxiadenina (isoguanina) e N₇-óxido de isoguanina (Yamamoto, 1980). Em trabalhos mais recentes, quando solução de adenina é irradiada com radiação gama, foi detectado por HPLC a formação de 8-hidroxiadenina. Deve-se salientar que o perfil cromatográfico (Hartmann *et al.*, 2007) foi similar ao obtido deste trabalho aqui descrito. De modo semelhante, a descarga em gás argônio (Ar) promove a formação de íons e elétrons energéticos, resultando na radiólise da adenina aquosa. Neste experimento foram detectados 4,6-diamino-5-formamidopirimi-dine, 8-hidroxiadenina e 2-hidroxiadenina (Su *et al.*, 2011).

Os hidróxidos e óxidos de purinas são conhecidos por terem relevância biológica. Foi reportado a possibilidade de N₁-óxido de adenina ter função antimetabólica (Brown *et al.*, 1958). Para 7-hidroxiguanina, é descrito como um antimetabólito (Kitahara *et al.*, 1985) e 7-óxido de guanina como um antitumor antibiótico (Kern *et al.*, 1985). Por outro lado, alguns N_x-óxidos de purinas são conhecidos como agentes oncogênicos (Brown *et al.*, 1965). Estas bases nitrogenadas quando oxidadas, 2-hidroxiadenina, 8-hidroxiadenina entre outras, possuem potencial mutagênico (Kamiya, 2003).

Esses resultados sugerem que a irradiação de adenina em solução resulta na formação de uma variedade de espécies. No entanto, não resulta na total decomposição de adenina, uma vez que os produtos formados são similares à molécula de adenina. O baixo valor de G sugere que adenina é resiliente quanto à decomposição por radiação ionizante.

3.5.2. Relevância da Água do Mar Prebiótica

A irradiação de adenina no estado sólido promove a formação de espécies radicais, detectadas por espectroscopia RPE. Por outro lado, a irradiação de adenina sólida obtida por meio da liofilização em solução de água do mar (4,0 Ga) há a promoção de radicais, mas nesse caso, também há a contribuição de radicais provenientes dos íons sulfatos presentes na água do mar (ver equação 1).

Para os experimentos em solução observam-se menor decomposição e menores valores de G para irradiação de adenina em solução de água do mar (4,0 Ga). Um resultado significativo é no valor de pH, em que ocorrem pequenas alterações em água do mar (4,0 Ga) e em solução de MgSO_4 (Figura 4), com exceção para dose de 71,12 kGy. Sulfato de magnésio é o principal sal neste modelo de água do mar, e o cátion Mg^{2+} interage por coordenação bivalente com a molécula de adenina, diminuindo sua energia (Anizelli *et al.*, 2014). Entretanto, a menor decomposição de adenina não depende apenas dos cátions e ânions dissolvidos, uma vez que nas soluções salinas não há diferenças estatística nas concentrações remanescentes de adenina, quando comparadas com ensaios em água destilada.

Hata *et al.* (2015), com auxílio de cálculos teóricos, apresentam 182 reações relacionadas à formação de radical em água do mar, que contém os íons Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- e Br^- . Investigações experimentais sobre irradiação de água do mar demonstram o aumento na formação de H_2 (Kumagai *et al.*, 2013) e H_2O_2 (Hata *et al.*, 2016), que são espécies produzidas pela irradiação da água (Equação 3), pela inibição das reações do radical $\bullet\text{OH}$, chamada *OH-scavenging*. Essa inibição é atribuída à presença do íon Br^- (Hata *et al.*, 2016). Assim, estas informações contribuem para explicar a diferença encontrada nos ensaios com o modelo de água do mar (4,0 Ga), os quais contém o íon brometo (Br^-).

Portanto, esses ensaios elucidam a importância dos sais provenientes das soluções de água do mar em experimentos de Química Prebiótica. Pode-se inferir que em solução de água do mar (4,0 Ga), adenina possui maior resistência contra decomposição, por causa da junção dos sais no modelo de água do mar.

3.6. Conclusões

A irradiação gama dos sólidos de adenina obtidos da liofilização da solução em água destilada e água do mar 4,0 Ga resultaram em sinais RPE, que são atribuídos à formação de radicais de adenina e sulfato, respectivamente. Uma pequena decomposição de adenina é observada no sólido obtido de solução em água destilada. Para o sólido obtido a partir de água do mar é detectado a alteração no íon sulfato. Deste modo, assumi-se que os íons da água do mar também interagem com a radiação ionizante, diminuindo os efeitos provenientes da radiação nas biomoléculas.

A radiólise de adenina aquosa resulta na formação de hidróxidos e N_x -óxidos de adenina, que estariam disponíveis para alguns passos da evolução química. Além do mais, demonstrou-

se que em solução de água do mar, que se assemelha ao oceano primitivo (4,0 Ga), há uma menor decomposição da adenina aquosa pela exposição à radiação ionizante. Estes resultados reafirmam a importância de se utilizar análogos da água do mar em experimentos de Química Prebiótica, uma vez que diferenças na decomposição de adenina são observadas quando se utiliza água do mar (4,0 Ga), revelando-se em resultados de importância Prebiótica.

4. Estabilidade de adenina adsorvida sob montmorillonita KSF exposta a radiação ionizante

Neste capítulo, a radiólise de adenina adsorvida em montmorillonita KSF foi investigada. O principal resultado obtido é que adenina adsorvida pela argila, tanto em água destilada quanto em água do mar (4,0 Ga), a base nitrogenada é protegida contra radiação ionizante. No entanto, a dessorção de adenina só foi possível com uma solução de KOH (0,10 mol L⁻¹), indicando que adenina é fortemente ligada à argila. As análises por espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e difratometria de raios X (DRX) demonstram que a base nitrogenada é sorvida nas regiões de intercamadas da argila. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de Bernal, entretanto, sugerem pouca disponibilidade da adenina para futuras reações químicas.

4.1. Introdução

J. D. Bernal (1949 e 1951) sugeriu que minerais foram relevantes para evolução química, estes poderiam concentrar biomoléculas a partir de soluções diluídas, proteger contra degradação proveniente de radiação e hidrólise, catalisar reações orgânicas, e funcionar como código genético primitivo. Várias publicações demonstram que a hipótese de Bernal é possível (ver revisões de Lahav e Chang, 1976, Mosqueira *et al.*, 1996, Zaia, 2004 e 2012; Lambert, 2008). Desde a formação da Terra, radiação ionizante estava presente, oriunda de núcleos radioativos. Esta fonte de energia possui o diferencial de promover reações radiculares. Portanto, teve um papel importante na Evolução Química, favorecendo a reatividade de biomoléculas, especialmente, em meio aquoso, onde radicais livres são produzidos (Negrón Mendoza *et al.*, 2016).

É bem conhecido que a montmorillonita (mineral de argila 2:1), um filossilicato do grupo das esmectitas, é um bom material adsorvente de moléculas orgânicas e emergiu na Terra Primitiva por volta de 4,55-4,00 bilhões de anos atrás (Hazen *et al.*, 2008). Montmorillonita também foi encontrada na superfície de Marte (Poulet *et al.*, 2005). Por outro lado, adenina é uma purina, uma das bases nitrogenadas do DNA e RNA. Na Terra Primitiva duas fontes de adenina são possíveis: **i**) fontes exógenas, significando que adenina foi trazida para a Terra por meteoritos, cometas e poeira interplanetária, e; **ii**) fontes endógenas, em que adenina foi sintetizada na Terra Primitiva (Hayatsu *et al.*, 1975, Basile *et al.*, 1984, Ferris e Hagan Jr., 1984,

LaRowe e Regnier, 2008, Martins *et al.*, 2008). Desde que ambas montmorillonita e adenina encontravam-se na Terra Primitiva, estes são bons candidatos para ensaios em Química Prebiótica.

Adsorção de adenina, nucleosídeos e nucleotídeos de adenina em argilas são dependentes do valor de pH da suspensão, e da troca de cátions (Lailach *et al.*, 1968a e 1968b, Lailach e Brindley, 1969, Winter e Zubay, 1995, Benetoli *et al.*, 2008, Carneiro *et al.*, 2011, Feuillie *et al.*, 2013 e 2015, Pedreira-Segade *et al.*, 2016). A radiólise de adenina em solução, promovida por radiação ionizante, produz uma quantidade complexa de espécies químicas. A decomposição de adenina é conduzida por radicais livres da água produzidos pela radiação ionizante, e esses radicais são dependentes do valor de pH e oxigênio molecular (O₂) dissolvido (Conlay, 1963, Van Hemmen e Bleichrodt, 1971, Yamamoto e Fuji, 1986, Su *et al.*, 2011). A permanência das purinas e pirimidinas sorvidas em montmorillonita expostas a radiação gama foi reportada por vários autores (Guzman *et al.*, 2000, Guzman-Marmolejo, 2003, Guzman-Marmolejo *et al.*, 2009, Meléndez-López *et al.*, 2014). No entanto, a maioria dos experimentos de sorção e radiólise foram realizados em solução de água destilada, diferindo da composição estimada dos oceanos primitivos.

Baseados nos trabalhos de Izawa *et al.* (2010), Zaia (2012) sugeriu um modelo de água do mar artificial, que quando comparado com a composição da água do mar atual possui maiores quantidades; $Mg^{2+} > Ca^{2+} \gg Na^+ \approx K^+$ e $SO_4^{2-} \gg Cl^-$. Este modelo de água do mar assemelha-se a concentração salina dos oceanos primitivos de 4,0 bilhões de anos atrás (4,0 Ga). Os valores de concentração foram baseados nas quantidades de íons extraídas de um meteorito datado de 4,0 bilhões de anos atrás.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi de comparar a sorção de adenina sob montmorillonita em água destilada e solução de água do mar. Ademais, objetiva-se avaliar a resistência de adenina em suspensão de água destilada-argila e água do mar-argila expostas a radiação ionizante. As interações nos sistemas adenina-argila foram investigadas com as técnicas de espectroscopia no infravermelho (FT-IR), e difratometria de raios X (DRX).

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo Geral

Investigar a decomposição de adenina adsorvida em montmorillonita quando exposta à radiação ionizante.

4.2.2. Objetivos Específicos

Avaliar a recuperação de adenina em suspensão com água destilada e do mar em argila, quando exposta à radiação gama.

Identificar possíveis interações e efeitos dos sais da água do mar neste sistema e relacionar com a Química Prebiótica.

4.3. Materiais e Métodos

4.3.1. Adenina e montmorillonita

Adenina e montmorillonita KSF foram compradas de Sigma Aldrich® e Acros Organics®, respectivamente.

4.3.2. Vidrarias

Todas vidrarias utilizadas nos ensaios de irradiação foram limpas de acordo com os procedimentos de química de radiações. As vidrarias foram submetidas a uma mistura quente de HNO₃ e H₂SO₄ por 4h, seguidos por uma lavagem com água bidestilada e posteriormente com água ultra pura (MilliQ). As vidrarias foram aquecidas a 300 °C durante a noite para eliminação de matéria orgânica.

4.3.3. Água do mar artificial 4,0 Ga

A água do mar foi preparada pela dissolução em 1 L de água ultra pura dos seguintes sais: Na₂SO₄ (0,271 g), MgCl₂.6H₂O (0,500 g), CaCl₂.2H₂O (2,50 g), KBr (0,050 g), K₂SO₄ (0,400 g), e MgSO₄ (15,00 g) (Zaia, 2012).

4.3.4. Experimentos de irradiação

Dois conjuntos de experimentos foram conduzidos: **1**) soluções de adenina (500 µg mL⁻¹) em água ultrapura (MilliQ) e água do mar 4,0 Ga foram borbulhadas com gás argônio (Ar) para eliminação do oxigênio (O₂) dissolvido, antes dos ensaios de irradiação. Alíquotas de 5

mL das soluções de adenina foram adicionados em 100 mg de argila, as suspensões foram agitadas por 3 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 20.000 rpm a 15 °C em uma centrífuga Beckman Coulter Allegra™ 64R. A quantidade de adenina no sobrenadante foi medida por espectrofotometria (UV-Vis) e cromatografia (HPLC); 2) para os procedimentos de irradiação, ensaios de adsorção de adenina (500 µg mL⁻¹) em montmorillonita (100 mg) foram preparados em água ultra pura (MilliQ) e água do mar artificial (4,0 Ga). As amostras foram agitadas por 3 h e expostas a radiação gama. As amostras foram irradiadas em uma fonte de raios gama (Gammabeam 651-PT) à temperatura ambiente (298 K). A dose de irradiação foi determinada usando um dosímetro de sulfato ferroso-sulfato de cobre. A taxa de dose foi de 197 Gy min⁻¹. Doses de irradiação foram de 0 a 94,52 kGy. Após irradiação, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 20000 rpm a 15 °C, e o sobrenadante foi removido. Após irradiação adenina foi desorvida da argila pela agitação das amostras com 5 mL de uma solução de KOH (0,1 mol L⁻¹). A quantidade de adenina no sobrenadante foi medida por espectrofotometria (UV-Vis) e cromatografia (HPLC).

4.3.5. Espectrofotometria UV-Vis

A absorvância de adenina foi determinada em um espectrofotômetro UV-Vis Varian modelo Cary 100 Scan. A quantidade de adenina foi determinada por leituras em 260 nm e 266 nm para soluções ácidas e alcalinas, respectivamente. Equação 1 foi usada para a determinação da quantidade de adenina adsorvida em montmorillonita. Equação 2 foi usada para a determinação da quantidade de adenina desorvida de montmorillonita. Os termos *C* e *Abs* representam *concentração* e *absorvância*, respectivamente, da quantidade de adenina na solução padrão, sobrenadante da amostra, adsorvida e desorvida.

$$C_{adsorvido} (\mu\text{g mL}^{-1}) = C_{padr\tilde{a}o} - C_{amostra} \quad (\text{Equa\c{c}\~{a}o 1})$$

$$\text{onde } C_{amostra} = [(C_{padr\tilde{a}o})(Abs_{amostra}/Abs_{padr\tilde{a}o})]$$

$$C_{desorvida} (\mu\text{g mL}^{-1}) = [(C_{padr\tilde{a}o}) \cdot (Abs_{padr\tilde{a}o}/Abs_{amostra})] \quad (\text{Equa\c{c}\~{a}o 2})$$

4.3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Adenina foi quantificada em um cromatógrafo equipado com um detector UV-Vis e uma coluna C-18. A fase móvel empregada foi de 77 % A (acetato de amônia 0,1 mol L⁻¹ com pH ajustado para 4,5 com ácido acético) e 23 % B (mistura de 250 mL de acetonitrila, 250 mL de metanol e 4 mL de tetrahydrofurano). A taxa de fluxo foi de 0,3 mL min⁻¹ e a detecção realizada em 260 nm.

4.3.7. Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

Os espectros FT-IR foram obtidos com um acessório de reflectância (*PerkinElmer spectrum 400*, USA). Os espectros foram adquiridos no modo transmitância de 650 a 4000 cm⁻¹, e o número de varredura de 10.

4.3.8. Difratometria de Raios X (DRX)

Amostras foram analisadas nos modos orientados e pós orientados por difratometria de raios X. Medidas foram realizadas em um difratômetro *Empyrean* operando com uma voltagem de aceleração de 45V, e uma corrente de filamento de 30mA, usando radiação CuK α , monocromador e um detector PixCELL 3D. Todas amostras foram medidas em na faixa de 2-80° ângulo 2 θ com o passo de 0,04° (2 θ) e 40s te tempo do passo. A distância interplanar foi obtida pela lei de Bragg (equação 3). Os termos referem-se ao *número natural, n, comprimento de onda dos raios X, λ , distância interplanar, d, função trigonométrica seno, sen, e ângulo incidente, θ .*

$$n\lambda = 2dsen\theta \quad \text{(Equação 3)}$$

4.3.9. Análise Estatística

O teste Tukey foi realizado para analisar a quantidade de adenina em diferentes níveis de significância (p<0,05).

4.4. Resultados

4.4.1. Ensaio Quantitativos

Para água destilada e água do mar, a quantidade de adenina adsorvida sob montmorillonita foi de 99,8 % e 98,4 %, respectivamente, esses valores não são estatisticamente diferentes entre si (Tabela 1, p<0,05). O valor de pH das suspensões após sorção variou de 2,20

a 2,74. Nessa faixa de pH, devido a protonação do nitrogênio N₁ (pK_{a1} = 4,2) adenina estava positivamente carregada (Christensen *et al.*, 1970) e porque montmorillonita possui o ponto isoelétrico de pK_{iso} = 2,04 (Carneiro *et al.*, 2013), portanto os grupos de borda (*egde groups*) estão carregados negativamente. Assim, a carga da região entre camadas é negativa e independente do valor de pH.

As amostras de adenina adsorvidas em montmorillonita em água destilada e água do mar 4,0 Ga foram irradiadas com doses de 23,71, 47,26, 71,12 e 94,52 kGy. De modo a avaliar a resistência da adenina adsorvida em montmorillonita sob exposição de radiação gama, é necessário realizar a dessorção de adenina da argila.

Tabela 1. Adsorção de adenina em montmorillonita.

Mineral	Solução	Q (mg g ⁻¹)	Q (%)	Intervalo de pH
Montmorillonita	Água destilada	24,96 ± 0,08	99,8	2,20 – 2,53
	Água do mar (4,0 Ga)	24,59 ± 0,11	98,4	2,68 – 2,74

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. O número de sets foi de n = 8. Em cada ensaio 5 mL de adenina (500 ug mL⁻¹) foi adicionado em 100 mg de argila. Q representa a quantidade de adenina adsorvida em mg g⁻¹ de mineral ou em porcentagem %. Teste Tukey (p > 0,05) para Q (mg g⁻¹). Água do mar (4,0 Ga) foi preparada como descrito por Zaia (2012).

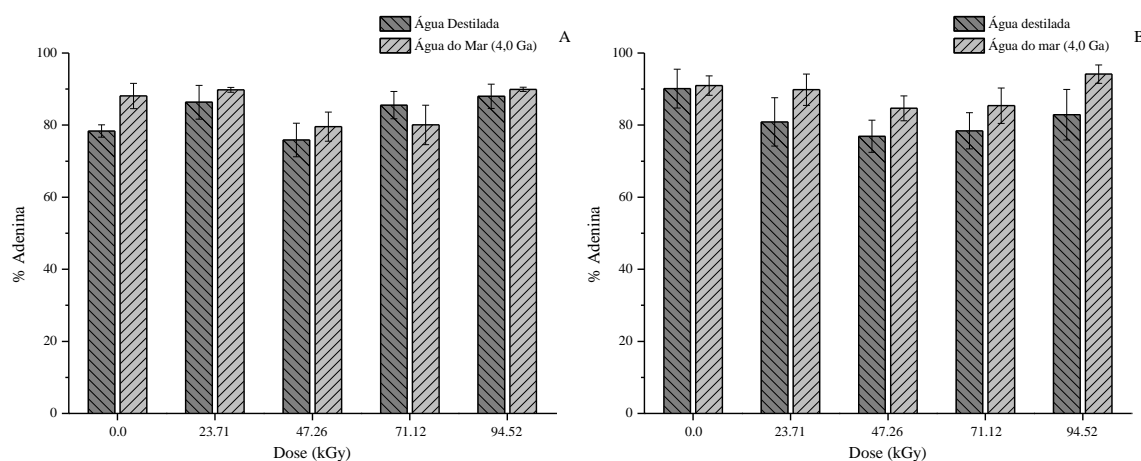


Figura 1. Recuperação de adenina adsorvida em montmorillonita em função da dose. Gráfico: **A)** Espectrofotometria UV-Vis; **B)** Cromatografia (HPLC). Todos valores foram estatisticamente iguais entre si (Teste Tukey, p > 0,05). Cada resultado é a média de três ensaios com uma amostra cada. Após irradiação, adenina foi dessorvida da montmorillonita usando solução de KOH 0,01 mol L⁻¹. Água do mar (4,0 Ga) foi preparada como descrito por Zaia (2012).

A dessorção foi realizada com uma solução de KOH (0,1 mol L⁻¹). Sob essas condições, a decomposição de adenina não ocorre. Para esta base nitrogenada, sua decomposição é iniciada quando aquecida a 95 °C em solução de KOH 1,0 mol L⁻¹ (Stevens *et al.*, 1959). Adenina em soluções alcalinas (pH > 9,87) é negativamente carregada devido a desprotonação (Christensen *et al.*, 1970). Deste modo, o máximo do pico de absorção de adenina no espectro UV desloca de 260 para 266 nm. Para os ensaios em água destilada e água do mar, a recuperação de adenina após dessorção com solução de KOH foi de 78,35 ± 1,72 % e 88,05 ± 3,50 %, respectivamente (Figura 1). Os valores não foram estatisticamente diferentes entre si (p>0,05). Para amostras de adenina adsorvidas em montmorillonita em água destilada ou água do mar (4,0 Ga), a quantidade de adenina dessorvida em amostras irradiadas ou amostras controle (não irradiadas) não foram estatisticamente diferentes entre si (Figura 1, p>0,05). Esses resultados demonstram que adenina foi adsorvida em montmorillonita e foi protegida contra radiação ionizante. Deve ser pontuado que nenhum outro produto de decomposição de adenina foi observado nas amostras analisadas por cromatografia (HPLC). Adenina e outras bases nitrogenadas são facilmente decompostas em solução, quando exposta à radiação ionizante (Scholes *et al.*, 1960, Hartmann *et al.*, 2007). No entanto, em presença de argilas, a decomposição diminui (Guzman *et al.*, 2000, Guzman-Marmolejo, 2003, Guzman-Marmolejo *et al.*, 2009, Meléndez-López *et al.*, 2014).

4.4.2. Ensaios Qualitativos

Para o melhor entendimento do processo de sorção de adenina em montmorillonita, espectros infravermelhos (FT-IR) e difratogramas de raios X foram adquiridos. Espectros FT-IR da montmorillonita sem tratamento prévio mostraram três bandas maiores em 1010, 1635 e 3072 cm⁻¹, e um ombro em 3618 cm⁻¹ (Figura 2-1). A banda larga em 1010 cm⁻¹ é uma somatória de várias frequências atribuídas às deformações Si-O (Bukka *et al.*, 1992). A banda em 1635 cm⁻¹ é atribuída a hidratação da argila ou H-O-H *bending* (Bukka *et al.*, 1992, Tyagi *et al.*, 2016). A banda larga em 3072 cm⁻¹ e o ombro em 3618 cm⁻¹ são atribuídas a hidratação por água e deformação O-H de grupos estruturais (Madejová, 2003).

As amostras agitadas de montmorillonita com água destilada e/ou água do mar (4,0 Ga) foram liofilizadas, e mostraram que a absorção das bandas na região de 1635 e 3072 cm⁻¹ diminuí, devido a retirada de moléculas de água (Figura 2). Em adição, para amostras tratadas com água destilada e do mar (4,0 Ga), as bandas em 1635 e 3072 cm⁻¹ deslocam para 1631/1622 e 3399 cm⁻¹, respectivamente (Figura 2), indicando a desidratação da argila (Madejová, 2003).

A amostra de montmorillonita tratada com água do mar (4,0 Ga) (Figura 2, amostras 3) mostrou a banda em 667 cm^{-1} que pode ser atribuída ao *bending* SO do íon sulfato (SO_4^{2-}) (Iishi, 1979, Anbalagan *et al.*, 2009). As bandas atribuídas ao estiramento SO na região em 1130 cm^{-1} (Anbalagan *et al.*, 2009) não são observadas, uma vez que o espectro da montmorillonita possui uma banda larga na mesma região (Figura 2). No entanto, deve ser notado que nos difratogramas de raios X mostram padrões atribuídos à gesso precipitado em montmorillonita (Figura 4).

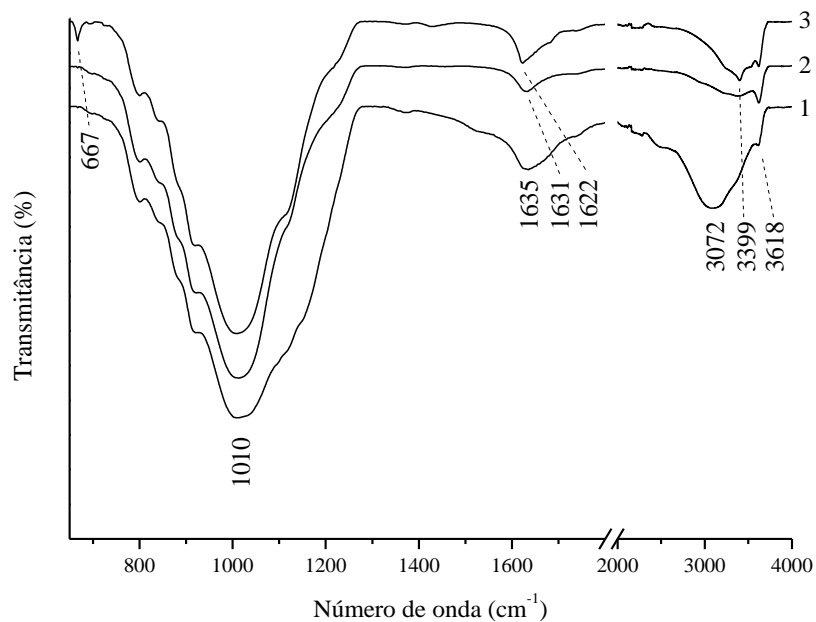


Figura 2. Espectros FT-IR de: **1)** montmorillonita sem tratamento; **2)** montmorillonita agitada com água destilada; **3)** montmorillonita agitada com água do mar (4,0 Ga). Amostras foram agitadas por 3h. Água do mar (4,0 Ga) foi preparada como descrito por Zaia (2012). As bandas em 667 e 1010 cm^{-1} são atribuídas ao *bending* SO do íon sulfato (SO_4^{2-}) e frequências a deformações Si-O, respectivamente. As bandas na região em 1635 cm^{-1} são atribuídas a hidratação da argila ou *bending* H-O-H, e a banda em 3072 cm^{-1} à hidratação da água e deformação O-H de grupos estruturais.

Adenina tem duas bandas em 1599 e 1667 cm^{-1} (Figura 3-a) atribuídas ao estiramento (C=C) e ao *bending* no plano (NH_2) (Anizelli *et al.*, 2014). Após a sorção de adenina em montmorillonita em água destilada e água do mar (4,0 Ga) a banda em 1599 desloca para 1624 e 1620 cm^{-1} , enquanto que a banda em 1667 desloca para 1702 e 1699 cm^{-1} , respectivamente (Figura 3-b, c; amostras 4 e 5). Este deslocamento deve-se à protonação da molécula de adenina (Anizelli *et al.*, 2014). Deve ser notado que na banda em 1620 cm^{-1} montmorillonita exibe uma banda devido a hidratação da água (Figura 3; amostras 2 e 3). Os espectros FT-IR da adenina

adsorvida em montmorillonita em água destilada mostraram ombros em 1599 e 1667 cm^{-1} , quando expostas à radiação ionizante (94,52 kGy) (Figura 3-b, amostra 6). Essas duas frequências são as mesmas encontradas em adenina sólida (Figura 3-a). Não obstante, nos experimentos em água do mar (4,0 Ga) essas frequências não são observadas (Figura 3-c, amostra 7). Possivelmente, os sais fornecem alguma estabilização à estrutura da adenina, como reportado anteriormente por Anizelli *et al.* (2014).

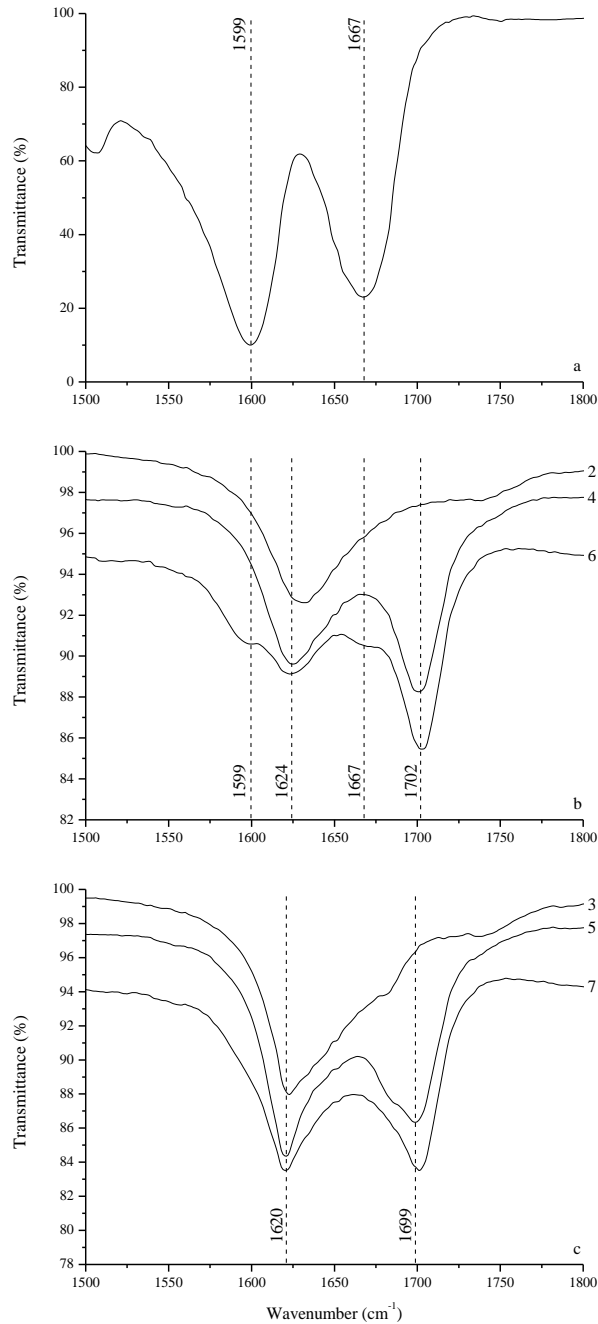


Figura 3. Espectros FT-IR de: **a)** adenina liofilizada; **b)** 2-montmorillonita agitada com água destilada, 4-montmorillonita agitada com adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água destilada e 6-montmorillonita agitada

com adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água destilada, irradiada a $94,52 \text{ kGy}$; e) **3**-montmorillonita agitada com água do mar (4,0 Ga), **5**-montmorillonita agitada com solução de adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água do mar (4,0 Ga) e **7**-montmorillonita agitada com solução de adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água do mar (4,0 Ga), irradiado a $94,52 \text{ kGy}$. Água do mar (4,0 Ga) foi preparada conforme descrito por Zaia (2012).

Para os dados de difratometria de raios X, montmorillonita sem tratamento prévio possui picos atribuídos à montmorillonita, illita, quartzo e dois pequenos picos atribuídos à gipsita (Figura 4-a, amostra 1). No entanto, quando montmorillonita é agitada com água destilada os picos atribuídos ao Gesso desaparecem, e os outros picos se mantêm (Figura 4-a, amostra 2). Além do mais, quando montmorillonita é agitada com água do mar (4,0 Ga), além dos picos atribuídos a montmorillonita, illita e quartzo, outros seis picos atribuídos à fase gesso são observados (Figura 4-a, amostra 3). Este resultado foi confirmado por espectroscopia FT-IR (Figura 2, amostra 3), e indica que o mineral gesso foi formado a partir dos íons Ca^{2+} e SO_4^{2-} presentes na solução de água do mar (4,0 Ga).

Para as amostras de montmorillonita agitadas com água destilada (Figura 4, amostra 2) e com água do mar (4,0 Ga) (Figura 4, amostra 3), quando comparadas com montmorillonita sem tratamento prévio (Figura 4, amostra 1), o pico relativo ao plano basal d_{001} desloca para menores valores ($^{\circ}2\theta$) e se apresenta mais definido. O valor de *largura à meia altura* (FWHM) foi maior para as amostras 2 e 3 que quando comparado com a amostra 1 (Tabela 2). A distância do plano basal d_{001} , calculado pela Lei de Bragg, das amostras 1, 2 e 3 foi de 12,3, 13,7, e 13,9 Å, respectivamente (Tabela 2). Nguyen-Thanh *et al.* (2005) também observaram valores similares para distâncias no plano basal para Na-montmorillonita sem tratamento prévio. A expansão de grade é seguida por alterações nos valores de distância no plano basal (d_{001}). Os deslocamentos estão relacionados com o espaçamento ou distância interplanar do plano basal (d_{001}) da montmorillonita (Nguyen-Thanh *et al.*, 2005).

Após a sorção de adenina em montmorillonita usando água destilada ou água do mar (4,0 Ga) (Figura 4, amostras 4 e 5), os difratogramas de raios X dessas amostras mostram os mesmos picos da montmorillonita sem adenina adsorvida. Deve ser pontuado que adenina não previne a precipitação de gesso em montmorillonita. Das amostras 4 a 7 possuem valores de FWHM próximos a 1,3 para amostras não orientadas e orientadas (Tabela 2). Isso implica que a adição de adenina no sistema aumenta a cristalinidade da argila. A maior cristalinidade verifica-se no primeiro pico (d_{001}) dos dados de difratometria de Raios X, por meio da estimativa do valor de largura à meia altura (FWHM). A sorção de adenina preenche os espaços

de entre camadas, aumentando a ordem do empilhamento (*stacking*) das camadas da argila, e consequentemente aumentando a cristalinidade das mesmas. Baú *et al.* (2012) observaram aumento na cristalinidade com a adição de adenina em zeólitas. O que, entretanto, não é devido ao mesmo efeito, uma vez que zeólitas não são minerais em camadas capazes de expansão.

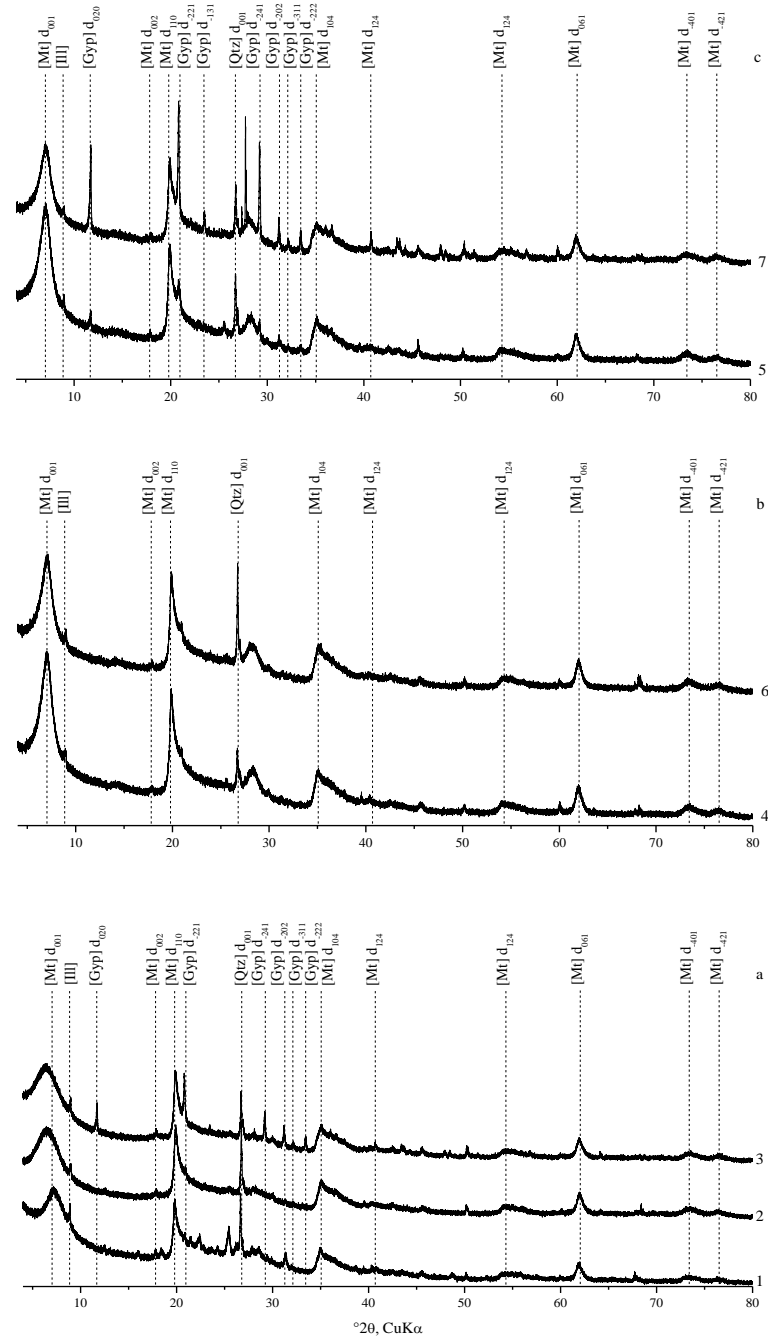
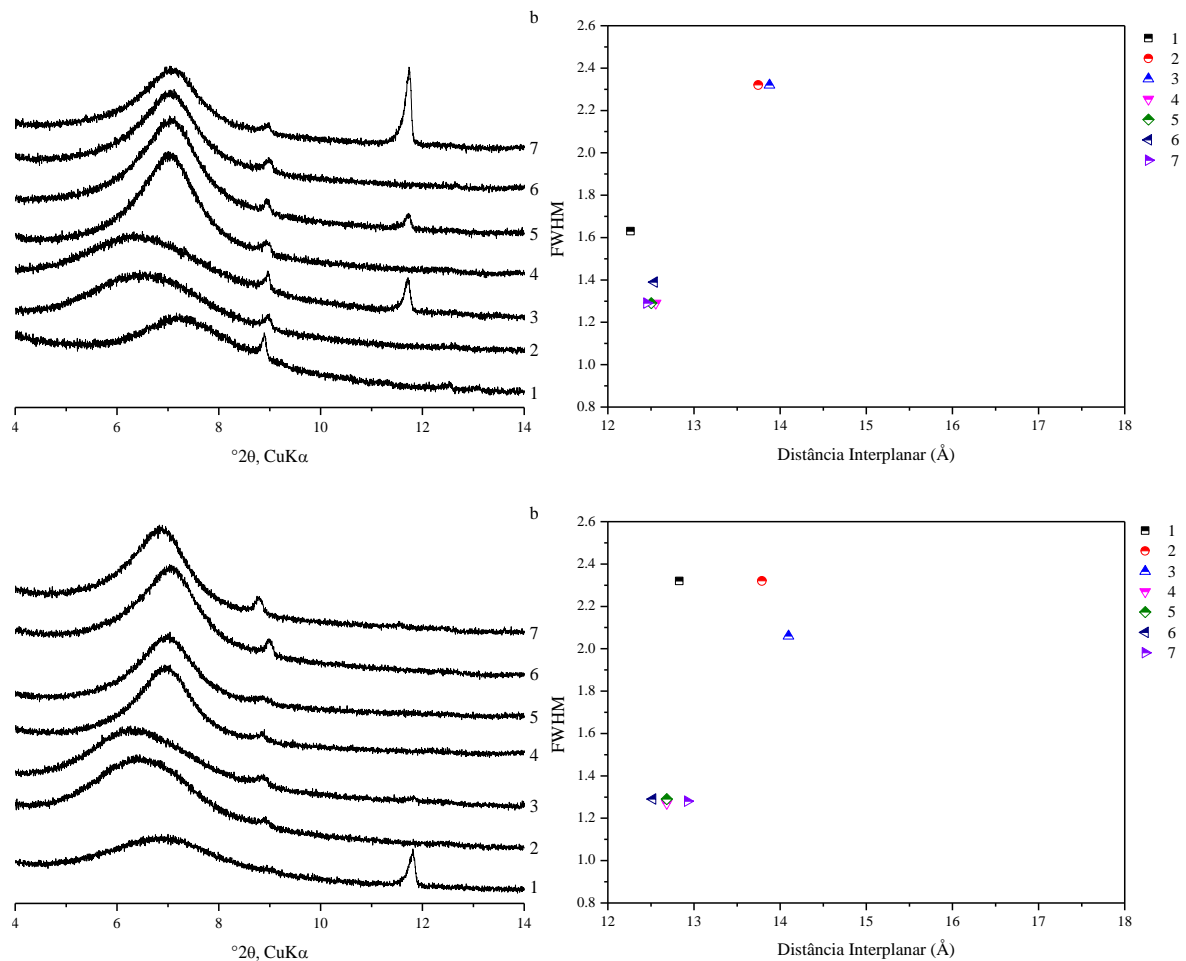


Figura 4. Difratogramas de raios X de: **a)** 1-montmorillonita sem tratamento prévio; 2-montmorillonita agitada com água destilada; 3-montmorillonita agitada com água do mar (4,0 Ga); **b)** 4-montmorillonita agitada com adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água destilada e 6-montmorillonita agitada com adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água destilada, irradiada a 94,52 kGy; **c)** 5-montmorillonita agitada com solução de adenina

(500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) em água do mar (4,0 Ga) e 7-montmorillonita agitada com solução de adenina (500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) em água do mar (4,0 Ga), irradiado a 94,52 kGy. Água do mar (4,0 Ga) foi preparada conforme descrito por Zaia (2012).

De modo a obter-se um melhor entendimento na variação do espaço entre camadas, as amostras foram submetidas a deposição orientada e introdução de etileno glicol. O pico relativo ao plano basal d_{001} é alterado, dependendo do tratamento das amostras (Figura 5). A principal diferença entre os valores de FWHM das amostras não orientadas e orientadas é observada na amostra 1, em que muda de 1,6 para 2,3, enquanto que a distância interplanar muda de 12,3 para 12,8 Å (Tabela 2). Deve ser notado que o processo de orientação consiste em adicionar água destilada, criando uma suspensão que é seca ao ar. Após o tratamento com etileno glicol das amostras 1, 2 e 3 a distância interplanar aumenta até 17,1 Å, significando que o etileno glicol entrou nas regiões de intercamadas da montmorilonia (Tabela 2). Por outro lado, quando adenina é adsorvida em montmorillonita (amostras 4-7) um pequeno aumento até 13,2 Å é observado. Isso indica que o etileno glicol não entrou na região de intercamada da montmorillonita, devido a presença de adenina nestas regiões.



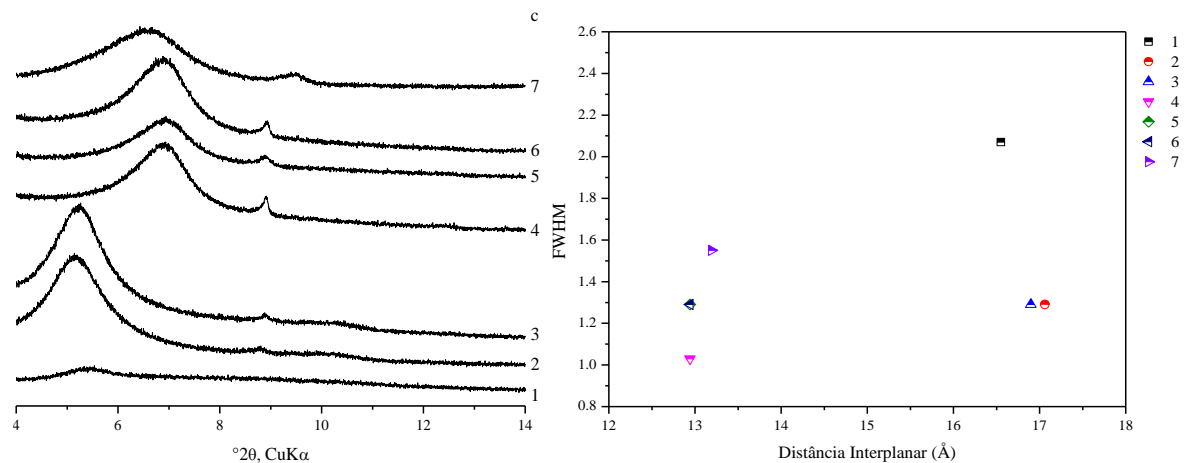


Figura 5. Difratomogramas de raios X das amostras: **a)** não orientadas; **b)** orientadas; **c)** tratadas com etileno glicol (Imagem à esquerda). Sólidos obtidos de: **1-**montmorillonita sem tratamento prévio; **2-**montmorillonita agitada com água destilada, **3-**montmorillonita agitada com água do mar (4,0 Ga), **4-**montmorillonita agitada com adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água destilada, **5-**montmorillonita agitada com solução de adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água do mar (4,0 Ga), **6-**montmorillonita agitada com adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água destilada, irradiada a 94,52 kGy e **7-**montmorillonita agitada com solução de adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água do mar (4,0 Ga), irradiado a 94,52 kGy. Gráficos plotados com valores de FWHM (*Largura à meia altura*) pela distância interplanar (Å) (Imagem à direita). Água do mar (4,0 Ga) foi preparada conforme descrito por Zaia (2012).

Tabela 2. Distância interplanar e valores FWHM.

Amostra	Não orientadas		Orientadas		Glicoladas	
	d (Å)*	FWHM**	d (Å)	FWHM	d (Å)	FWHM
1	12,3	1,6	12,8	2,3	16,6	2,1
2	13,7	2,3	13,8	2,3	17,1	1,3
3	13,9	2,3	14,1	2,1	16,9	1,3
4	12,6	1,3	12,7	1,3	12,9	1,0
5	12,5	1,3	12,7	1,3	12,9	1,3
6	12,5	1,4	12,5	1,3	12,9	1,3
7	12,5	1,3	12,9	1,3	13,2	1,6

Amostras: **1-**montmorillonita sem tratamento prévio; **2-**montmorillonita agitada com água destilada, **3-**montmorillonita agitada com água do mar (4,0 Ga), **4-**montmorillonita agitada com adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água destilada, **5-**montmorillonita agitada com solução de adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água do mar (4,0 Ga), **6-**montmorillonita agitada com adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água destilada, irradiada a 94,52 kGy e **7-**montmorillonita agitada com solução de adenina ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) em água do mar (4,0 Ga), irradiado a 94,52 kGy.

* Distancia Interplanar.

** Largura à meia altura (*Full Width at Half Maximum*).

4.5. Discussão

4.5.1. Adsorção e proteção da adenina sob superfície mineral

É bem conhecido que a radiação ionizante possui alguns efeitos em argilominerais. Gournis *et al.* (2000) e Plötze *et al.* (2003) observaram que o Fe^{3+} é parcialmente reduzido para Fe^{2+} . Esta reação é atribuída à formação do radical H^\bullet das moléculas de águas intercaladas na montmorilonta. Devido a tamanho pequeno do radical hidrogênio, neste é possível ocorrer difusão pelos anéis hexagonais (Si-O) da camada tetraédrica para a camada octaédrica, assim reduzindo o Fe^{3+} . Além do mais, radical OH^\bullet e H_2O_2 são formados (Gournis *et al.*, 2000). No entanto, em outros parâmetros físico químicos não são observados efeitos provenientes da radiação gama na montmorillonita ou em outras argilas. Mediante da espectroscopia EPR, Gournis *et al.* (2001) observaram a formação de defeitos paramagnéticos em laponita e SWy-1 (argila) após irradiação. Também foi observado a migração do íon Li^+ em direção sítios octaédricos vazios de SWy-1 e zenith. A molécula de H_2 pode ser produzida pelo radical H^\bullet das moléculas de águas encontradas nas intercamadas ou pela quebra da ligação O-H dentro na camada do mineral (Fourdrin *et al.*, 2013). Pelas espectroscopias FT-IR, ^{27}Al e ^{29}Si RMN, Negron *et al.* (2002) não observaram mudanças estruturais na montmorillonita em até 2000 kGy de exposição de radiação gama. Apenas foi observada uma pequena variação no teor de água. Assim sendo, como neste presente trabalho uma baixa dose de exposição à radiação gama foi utilizada (94,52 kGy), assume-se que a argila não sofreu aparente mudanças estruturais.

A adsorção de adenina em montmorillonita pode ser entendida por dois diferentes mecanismos: **1)** interações eletrostáticas entre a superfície da montmorillonita (negativamente carregada) e a molécula de adenina (positivamente carregada), seguida provavelmente pela intercalação de adenina catiônica (positivamente carregado) nas entre camadas da argila (negativamente carregada); **2)** pela interação do grupo $-\text{NH}_2$ da adenina com a montmorillonita. O deslocamento da banda em 1667 cm^{-1} (*bending* no plano $\beta(\text{NH}_2)$) para região em 1700 cm^{-1} (Figura 3) sugere que o grupo NH_2 da adenina interage com a montmorillonita. Por outro lado, Anizelli *et al.* (2014) observaram que a banda em 1667 cm^{-1} desloca para 1699 cm^{-1} e uma nova banda em 1573 cm^{-1} quando o nitrogênio N_1 da adenina é protonado. Essa banda (1573 cm^{-1}) não é observada no espectro (Figura 3, amostras 4 e 5). Deve ser notado que os valores de pH das suspensões indicam um meio ácido (Tabela 1), resultando na protonação do N_1 (Christensen *et al.*, 1970). Portanto, infere-se que o grupo NH_2 interage com a argila, e interações eletrostáticas também ocorrem. Uma vez que etileno glicol não entra na região entre camadas

da argila, após sorção de adenina (Tabela 2), a intercalação de adenina em montmorillonita também ocorre. Isso significa que adenina (positivamente carregada) interage com a superfície da região intercamada da montmorillonita (negativamente carregada), deste modo, prevenindo o etileno glicol de entrar neste espaço (Lailach e Brindley, 1969, Weckhuysen *et al.*, 1999, Carneiro *et al.*, 2011).

Vários autores observaram a diminuição da quantidade de adenina sorvida quando o valor de pH da suspensão aumenta (Lailach *et al.*, 1968a, 1968b, Lailach e Brindley, 1969, Winter e Zubay, 1995, Benetoli *et al.*, 2008, Carneiro *et al.*, 2011). Deste modo, é inferido que interações eletrostáticas e a entrada da biomolécula na intercamada da montmorillonita desempenha o papel principal no processo de sorção. Uma vez que o aumento no valor de pH implica inicialmente na neutralidade da molécula de adenina, e em seguida em cargas negativas (Christensen *et al.*, 1970), conclui-se que as interações eletrostáticas diminuem. Deve ser pontuado que no caso de nucleotídeos em valores baixos de pH (meio ácido), o nitrogênio N₁ é envolvido no processo de adsorção, enquanto que em valores maiores de pH (meio alcalino) o grupo fosfato participa da adsorção (Feuillie *et al.*, 2013).

Para tratamentos com etileno glicol, amostras sem adenina, a distância interplanar (Tabela 2) teve maiores valores do que para amostras com adenina. Isso indica que o etileno glicol não entrou na região entre camadas da montmorillonita, uma vez que adenina ocupou os sítios das entre camadas da argila.

A quantidade de adenina que foi dessorvida da montmorillonita com solução de KOH (0,1 mol L⁻¹) variou de 78 a 88 % (Figura 1). Guzman-Marmolejo (2003) também obteve valores similares na recuperação de adenina após uma extração com solução de KOH (pH 14). De acordo com o autor, após 4 extrações, em torno de 97 % de adenina é recuperada da argila. Desorção de adenina em montmorillonita também foi realizada com água destilada, CaCl₂ (0,01 mol L⁻¹) e reagente Mehlich-1 (0,050 mol L⁻¹ de HCl mais 0,0125 mol L⁻¹ de H₂SO₄). Utilizando estas três soluções extratoras foi dessorvido em torno de 4,1 a 6,6 % de adenina em montmorillonita. Esses resultados foram confirmados por espectroscopia FT-IR (Figura 6).

Os espectros FT-IR das amostras após dessorção com solução de KOH (0,1 mol L⁻¹) não apresentaram a banda característica da adenina na região de 1700 cm⁻¹. Por outro lado, quando ensaios de dessorção foram realizados com soluções de CaCl₂ (0,01 mol L⁻¹) e Mehlich-1 (0,050 mol L⁻¹ de HCl mais 0,0125 mol L⁻¹ de H₂SO₄), os espectros FT-IR apresentaram a banda característica da adenina na região de 1700 cm⁻¹. Em química de solos, os reativos CaCl₂ e

Mehlich-1 são usados para verificar se uma substância é adsorvida em um sólido com os modelos de complexo de esfera externa e interna, respectivamente (Sposito, 1989).

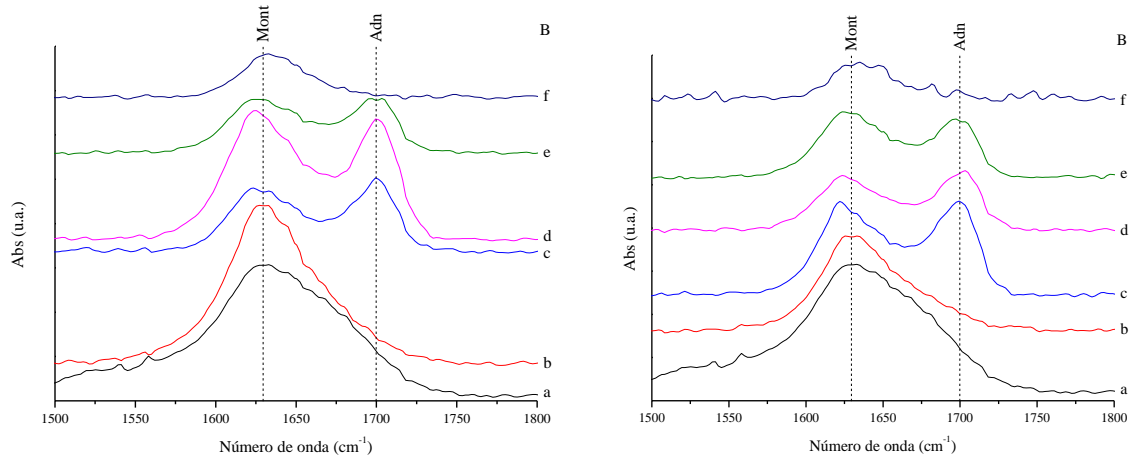


Figura 6. Gráfico: **A)** ensaios em água destilada; **B)** ensaios em água do mar (4,0 Ga). Espectros FT-IR de: **a)** montmorillonita sem tratamento; **b)** montmorillonita agitada com solução sem adenina (amostra controle); **c)** montmorillonita agitada com solução de adenina; **d)** Dessorção com solução de CaCl_2 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$); **e)** Dessorção com solução de Mehlich-1 ($0,050 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl mais $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4); **f)** Dessorção com solução de KOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Adenina e outras bases nitrogenadas são facilmente decompostas em solução quando expostas à radiação ionizante (Scholes *et al.*, 1960, Hartmann *et al.*, 2007). No entanto, na presença de argila a decomposição diminui (Guzman *et al.*, 2000, Guzman-Marmolejo, 2003, Guzman-Marmolejo *et al.*, 2009, Meléndez-López *et al.*, 2014). Nestes ensaios, a recuperação de adenina por dessorção nas amostras irradiadas foi estatisticamente a mesma das amostras não irradiadas (Figura 1). Entretanto, usando 125 kGy, Guzman-Marmolejo (2003) observou uma decomposição de adenina perto de 20 % quando uma solução de adenina ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi adsorvida em 100 mg de montmorillonita. Por outro lado, quando utilizado uma solução mais concentrada ($1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e uma dose de 180 kGy, a decomposição foi menor. Deve ser pontuado que neste presente trabalho a concentração de adenina foi de $3,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e a maior dose foi de 94,52 kGy.

Outro ponto é que nenhum produto de decomposição foi observado. No entanto, para adenina dissolvida em água destilada e adsorvida em montmorillonita, após irradiação, o espectro FT-IR da amostra mostrou dois ombros com as mesmas frequências que adenina sólida (Figura 3-b). Deve ser ressaltado que na análise cromatográfica nenhum pico que indicasse decomposição de adenina foi observado. O aparecimento de frequências em 1599 e 1667 cm^{-1}

(ombros), após irradiação pode ser devido a desprotonação da adenina por irradiação. Deve ser notado que nem toda adenina sofre processo de desprotonação, uma vez que a intensidade das bandas é baixa. Além do mais, a irradiação de cristais de adenina com raios X (Nelson *et al.*, 1992) investigações teóricas por DFT (Teoria de Densidade Funcional) sugerem que radicais de adenina dehidrogenada são formados pela radiação ionizante (Wetmore *et al.*, 1998). Não obstante, transferência protônica intramoleculares no estado excitado (*Excited-State Intramolecular Proton Transfer – ESIPT*), um mecanismo de protonação e desprotonação pela ligação de hidrogênio, acontece, em outras palavras, transferência de prótons. ESIPT é um fenômeno de tunelamento, onde a transferência de prótons é induzida pela radiação ionizante, promovendo a formação de tautômeros (Tang *et al.*, 2011), ou também pode ser definido como o transporte de um próton de uma molécula inicialmente oxidada para uma espécie fortemente aceptora de elétrons (Nelson *et al.*, 1998). Neste cenário, adenina está protonada no nitrogênio N₁, e adsorvida nas regiões entre camadas da montmorillonita, portanto, é plausível a perda do próton-N₁, induzida pela radiação ionizante. Nelson *et al.* (1992 e 1998) demonstram que a desprotonação da espécie adenina N₁-protonada no estado excitado ocorre mais facilmente em condições ácidas (pK_{a1}=4,2), pela subtração do próton-N₁ (H[•])

Por outro lado, quando adenina é dissolvida em água do mar (4,0 Ga) e adsorvida em montmorillonita, após exposição à radiação gama, o espectro FT-IR não apresentou essas frequências (ombros) (Figura 3-c). Se a desprotonação de adenina ocorreu em água destilada, mas não em água do mar (4,0 Ga). Provavelmente os íons presentes na água do mar consomem os radicais livres formados, uma vez que ânions são considerados OH[•] *scavengers* (Kumagai *et al.*, 2013, Hata *et al.*, 2016). Além do mais, os cátions bivalentes da água do mar são capazes de coordenar na posição bidentada, resultando na diminuição de energia dos orbitais HOMO da adenina e timina, portanto, tornando-as espécies menos reativas (Anizelli *et al.* 2014). Esses ensaios estão de acordo com a hipótese de Bernal, sobre proteção mineral para biomoléculas. Paralelo a isto, outra inferência pode ser elaborada. Sais da água do mar ou meio salino podem dar suporte para proteção de biomoléculas, diminuindo sua reatividade.

4.5.2. Implicações para a Química Prebiótica

De acordo com Bernal (1949 e 1951), minerais provavelmente desempenharam um papel importante para a origem da vida na Terra. Minerais seriam concentradores de biomoléculas a partir de soluções diluídas, catalisariam suas reações (formação de polímeros), protegeriam as biomoléculas contra hidrólise e decomposição por radiação e promoveriam um código genético

primitivo. Neste capítulo, é demonstrado que montmorillonita pode concentrar adenina proveniente de uma solução diluída e protege-la contra radiação ionizante. No entanto, vários trabalhos mostram que minerais concentram e protegem biomoléculas. A principal diferença desta pesquisa é o modelo de água do mar artificial (4,0 Ga) utilizado, que poderia representar melhor a Terra Primitiva. Maior parte dos outros trabalhos utilizam soluções em água destilada ou com cloreto de sódio (Zaia, 2012). Portanto, usando condições mais próximas as que existiam na Terra Primitiva, foi demonstrado que a hipótese de Bernal é plausível. No entanto, uma questão pouco discutida na literatura é sobre a forte adsorção de biomoléculas em minerais (Lambert, 2008). A dessorção de adenina em montmorillonita só foi possível usando uma solução de KOH altamente concentrada ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), significando que adenina está fortemente ligada à argila. Isso sugere que adenina não será facilmente dessorvida, assim sendo protegida contra hidrólise e radiação ionizante, mas não disponível para evolução química.

O fato de que adenina está fortemente ligada à montmorillonita leva a alguns apontamentos. Primeiramente, pode-se argumentar que adenina não estaria disponível para qualquer futura reação química, uma vez que está ligada, tornando-a indisponível. Não obstante, deve ser salientado que Lambert *et al.* (2013) demonstraram que quando o aminoácido glicina é sorvido nas entre camadas da argila, tornando-se pouco reativo para formação de peptídeos. Contudo, poderia ser também argumentado que em algumas vezes a imobilização é requerida a fim de promover reações de oligomerização. De fato, foi demonstrado que nucleotídeos e polinucleotídeos são sorvidos em montmorillonita e a formação de dímeros de nucleotídeo através de uma ligação fosfodiéster (Ferris *et al.*, 1989a, 1989b; Ferris 2002, 2005). Mesmo assim, experimentos de Ferris foram realizados com auxílio de agentes condensantes, ou seja, espécies que não estavam presentes na Terra Primitiva. Para simples bases nitrogenadas (adenina), até o momento nenhuma evidência de reações de dimerização foi publicada (Hashizume, 2015). Concluindo, de modo a simular reações de oligomerização, condições mais adequadas para Química Prebiótica devem ser investigadas, ou seja, utilizar apenas reagentes possíveis de existir na Terra Primitiva.

4.6. Conclusões

Mesmo que adenina é fisicamente protegida pela montmorillonita, contra altas doses de radiação ionizante, o sistema adenina-argila em água destilada apresenta mudanças na molécula de adenina. Apesar disto, em meio de água do mar nenhuma evidência de reação com adenina foi detectada. Portanto, o uso de análogos de água do mar mais sistemas com argilas em

Química Prebiótica mostra-se desenvolver proteção contra radiação ionizante. Deste modo, três principais apontamentos podem ser sumarizados por:

- 1) Adenina é fortemente ligada à superfície e entre camadas da argila, durante o processo de sorção (adsorção).
- 2) Montmorillonita foi capaz de totalmente proteger adenina contra alta dose de radiação ionizante.
- 3) Modelo de água do mar (4,0 Ga) proveu estabilização do sistema adenina-argila, diminuindo sua reatividade.

Concluindo, uma forte interação entre biomoléculas e superfície mineral é prejudicial para alguns processos prebióticos, e favorável para outros. Apesar de que não é claro o papel de fortes interações biomoléculas-superfície mineral, assim, mais investigações nesta área de estudo são necessárias.

5. Formação térmica de peptídeos sob superfície de goethita

Experimentos foram realizados com os aminoácidos (Gly e Ala) e duas amostras de goethita (G-I e G-II) obtidas a partir de sínteses diferentes. Foram preparados três tratamentos (A, B e C) simulando condições da Terra Prebiótica. Por meio das análises cromatográficas (HPLC) e espectrometria de massas (ESI-MS) foi observada a formação dos peptídeos. O experimento com glicina produziu peptídeos apenas para G-II. Para alanina, com ambas G-I e G-II foram sintetizados peptídeos. Entretanto, pelo tratamento seco/molhado (C) obteve-se maior rendimento. Não foram observadas mudanças no mineral com os tratamentos. A formação do peptídeo anidro (C-ala) se ajustou ao modelo cinético de ordem zero. A investigação cinética resultou em uma baixa constante de velocidade para a formação dos peptídeos. Por fim, os resultados suportam a hipótese de Bernal sobre a proteção e oligomerização de biomoléculas para a Evolução Química.

5.1. Introdução

Desde o clássico experimento de Miller (1953), sobre a síntese de aminoácidos em condições da Terra Primitiva, ensaios de Evolução Química tem se tornado objeto de interesse para pesquisadores em Química Prebiótica. A investigação dos mecanismos para formação da ligação peptídica também possui sua importância para o campo de estudo. Isto se dá de modo a formar oligômeros (pequenos peptídeos) por meio de dois ou mais monômeros, neste caso, aminoácidos. A formação da ligação peptídica acontece via a perda de um próton (H) e uma hidroxila (OH) provenientes de duas moléculas de aminoácidos, resultando em uma molécula de água e um (di) peptídeo (Figura 1). Desta forma, a formação de peptídeo ocorre mediante a desidratação de aminoácidos. Este processo seria improvável de acontecer em solução aquosa, uma vez que se torna necessário a diminuição da atividade da água. De acordo com John Desmond Bernal (1949 e 1951), minerais desenvolveram um papel importante na evolução química, e conseqüentemente origem da vida.

A polimerização termal de aminoácidos mediante a superfície de minerais tem sido amplamente estudada (Fox, 1995, Bujda[´]k e Rode, 1996, Meng, 2004, Marshall-Bowman, 2010, Shanker *et al.*, 2011, Kumar e Kamaluddin, 2012) e revisada (Lambert, 2008). O aquecimento da matriz mineral forneceria a energia necessária para a promoção da reação. A

então chamada Polimerização em rochas (*Polymerization on Rocks*) (Orgel, 1998) requereria um efeito catalítico de modo a aumentar a massa molecular da matriz orgânica. Por outro lado, poder-se-ia argumentar que a oligomerização de aminoácidos não ancora-se apenas no ponto de vista cinético, mas também no ponto de vista termodinâmico (Lambert, 2008). Alguns modos de ultrapassar o degrau termodinâmico se dão pelo fenômeno de adsorção, secagem da água por aquecimento e uso de agentes condensantes.

No campo da Química Prebiótica, uma das principais questões é “ *Quais minerais devem ser usados em experimentos de Química Prebiótica?* ” (Zaia, 2012). Com a hipótese de que a vida se originou na Terra (origem endógena), devem ser usados minerais que existiam na Terra Primitiva, anteriores à origem da vida. Na literatura poucas publicações exploraram o papel prebiótico dos óxidos e hidróxidos de ferro (Holm *et al.*, 1993, Matrajt e Blanot, 2004, Shanker *et al.*, 2011, Vieira *et al.*, 2011, Shanker *et al.*, 2012, Carneiro *et al.*, 2013, Shanker *et al.*, 2013, Kamaluddin, 2013, Canhisares-Filho *et al.*, 2015, Farias *et al.*, 2016, Georgelin *et al.*, 2017).

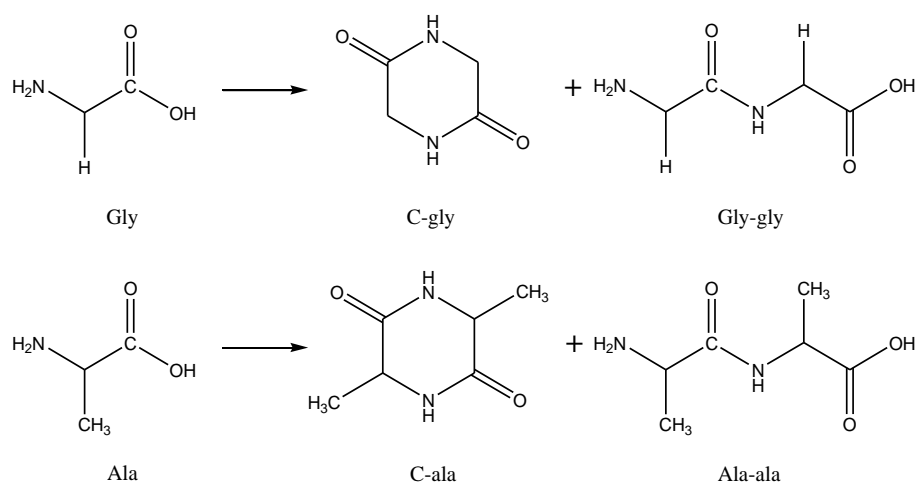


Figura 1. Estruturas químicas dos aminoácidos (Gly e Ala), peptídeos anídeos (C-gly and C-ala) e os dipeptídeos (G-gly e A-ala).

Glicina e alanina são aminoácidos proteicos simples, os mais comuns aos seres vivos, e foram sintetizados no experimento clássico de Miller (1953). São encontrados em maior concentração em meteoritos e em experimentos simulando a Terra prebiótica. São sugeridos por Zaia *et al.*, (2008) para serem usados em ensaios de química prebiótica. Goethita é um oxihidróxido de ferro com fórmula molecular FeOOH . É caracterizada por uma estrutura octaédrica com um átomo de ferro (Fe) ligado a seis íons de oxigênio (O) e ou hidroxilas (OH) (Cornell e Schwertmann, 2003) (estrutura representada no capítulo 1).

Este capítulo visa estudar a interação dos aminoácidos glicina e alanina com o mineral goethita sob aquecimento de 90 °C. As amostras foram submetidas ao aquecimento de 90 °C nos métodos A, B e C, e a formação de peptídeos foi investigada. A síntese de peptídeos necessita da união de duas moléculas de aminoácidos (Figura 1).

5.2. Objetivos

5.2.1. Objetivo Geral

Investigar a interação dos aminoácidos glicina e alanina com o mineral goethita obtido mediante duas rotas sínteses diferentes, sob aquecimento, em condições de química prebiótica.

5.2.2. Objetivos Específicos

Estudar a influência dos diferentes tratamentos térmicos sobre os aminoácidos Gly e Ala com Goethita, utilizando espectroscopias no infravermelho (FT-IR), de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), espectrofotometria UV-Vis e análise térmica (TG/DTG).

Avaliar a formação de peptídeos utilizando espectroscopia de massa e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

5.3. Materiais e Métodos

5.3.1. Biomoléculas

Foram utilizados os aminoácidos glicina, alanina, os peptídeos diglicina, dialanina, glicina anidrida, alanina anidrida. Os reagentes utilizados são de grau analítico, e foram comprados de Sigma-Aldrich® (EUA).

5.3.2. Mineral Goethita

As Goethitas I e II foram sintetizadas de duas formas diferentes. As sínteses foram adaptadas de Schwertmann e Cornell (1991): **G-I** Síntese via oxidação de Fe (II). Em um recipiente plástico com 300 mL de água destilada previamente purgada com gás nitrogênio (N₂), de modo a remover todo oxigênio (O₂) dissolvido, 3,0 g de cloreto ferroso tetra hidratado (FeCl₂.4H₂O) foram adicionados e solubilizados. Posteriormente adicionam-se 33 mL de uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 1,0 mol L⁻¹ sob forte agitação. Em seguida, removeu-se a purga de gás nitrogênio para que o precipitado de coloração verde marrom inicialmente gerado seja oxidado e forme o mineral goethita de coloração amarelada. Filtrou-

se o precipitado formado e lavou-se com água destilada como objetivo de remover espécies iônicas restantes; **G-II**) Síntese via hidrólise de Fe (III). Em um recipiente plástico, 400 mL da solução de hidróxido de potássio (KOH) $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas em 1659 mL da solução de nitrato férrico nonahidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura foi agitada vigorosamente até completa homogeneização. A solução foi deixada na estufa durante 60 horas a $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Do precipitado formado foi retirado o sobrenadante, e adicionado água ultra pura. Repetiu-se esse procedimento até que o material fique em suspensão. Após a lavagem, secou-se o material por liofilização.

5.3.3. Tratamentos Térmicos

As amostras foram preparadas em água ultra pura (MilliQ) e submetidas a três diferentes tratamentos (nomeados de A, B e C). Nos três tratamentos as amostras foram conduzidas a uma estufa à $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 dias. Prepararam-se amostras controles. **Tratamento A** representa um ambiente seco na Terra Primitiva. Uma porção de 100 mg de mineral foi mecanicamente misturada com 50 mg de aminoácido (Gly ou Ala). **Tratamento B** representa um ambiente úmido. Em uma porção de 100 mg de mineral, adicionou-se $500 \text{ } \mu\text{L}$ de solução (100 mg mL^{-1}) de aminoácido (Gly ou Ala). **Tratamento C** simula os ciclos secos/molhados (*wet/dry cycles*) na Terra Primitiva. Em uma porção de 100 mg de mineral, adicionou-se $500 \text{ } \mu\text{L}$ de solução (100 mg mL^{-1}) de aminoácido (Gly ou Ala), e completou-se o volume para 5 mL. Após 24 h de aquecimento na estufa, adicionou-se mais 5 mL de água ultra pura.

5.3.4. Extração dos aminoácidos

Para análise do produto formado realizou-se a extração da fase orgânica da matriz mineral, com água ultra pura. Em um tubo plástico de 15 mL adicionou-se 50 mg de amostra de cada tratamento (A, B e C) mais 10 mL de água ultra pura. A suspensão foi agitada por 15 min, e posteriormente centrifugada por mais 15 min, separando o material sólido do sobrenadante. O processo foi repetido por mais duas vezes, resultando ao final 30 mL de fase extraída. Os extratos foram filtrados em uma membrana de $22 \text{ } \mu\text{m}$. Então congelados e liofilizados para análise espectroscópica.

5.3.5. Experimento de Cinética

Foram preparadas quinze (15) amostras, em duplicata, pela adição de alanina em goethita G-II submetida ao tratamento C. Em cada tudo foram adicionados 20 mg da Goethita (G-II) e $200 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de alanina com concentração de 100 mg mL^{-1} . Dois tubos com controle para

o mineral e para o aminoácido foram preparados. Os tubos foram colocados na estufa a 90 °C, e a cada 24h adicionados mais 1 mL de água ultra pura. Do mesmo modo, a cada 24h eram retirados dois tubos de amostras e armazenados no congelador para encerrar a reação química. Os produtos formados foram caracterizados e quantificados por cromatografia (HPLC). A quantidade de peptídeos produzidas foram tratadas com as leis de velocidade para ordens de reação zero (equação 1), primeira (equação 2) e segunda ordem (equação 3).

$$[A] = [A]_0 - kt \quad (\text{Equação 1})$$

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt \quad (\text{Equação 2})$$

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt \quad (\text{Equação 3})$$

5.4. Instrumentação

5.4.1. Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

Espectros FT-IR das amostras de 400 a 4000 cm^{-1} foram obtidos utilizando um espectrofotômetro FT-IR da Bruker modelo Vertex 70, com acessório de refletância Platinum ATR. A resolução de 4 cm^{-1} e 10 varreduras foram utilizados para obtenção dos espectros. Na região *Far* (infravermelho longínquo), de 150 a 600 cm^{-1} , foram obtidos os espectros utilizando a resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras foram utilizados para obtenção dos espectros.

5.4.2. Difratometria de Raios X (DRX)

As amostras foram analisadas em lâminas não orientadas, na forma de pó. Os difratogramas foram obtidos em um equipamento Shimadzu, modelo XRD 6000, utilizando-se radiação $\text{CuK}\alpha$ e um monocromador, operando a 30 mA e 40 kV, numa varredura escalonada de 0,02 $^{\circ}2\theta$ por 0,6 segundos e amplitude de 5 a 70 $^{\circ}2\theta$. As posições dos picos foram analisadas usando o software X'PertHighScore 2.1.

5.4.3. Análise térmica (TG/DTG)

As curvas TG e DTG foram obtidas de um TGA 4000 da Perkin Elmer, a varredura foi feita de 30 a 800 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} , fluxo de nitrogênio de 40 mL min^{-1} , e utilizada 20 mg de massa da amostra, em um cadinho de cerâmica.

5.4.4. Análise Cromatográfica (HPLC)

As análises da glicina e dos peptídeos foram realizadas no cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) Perkin Elmer Flexar equipado com detector de UV-Vis Flexar FL. Os produtos foram injetados e separados em coluna C-18 (150 mm x 4,6 mm) com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A fase móvel utilizada foi isocrática (95 % A: 5 % B) composta de (A) 10 mmol L⁻¹ de fosfato monossódico (NaH₂PO₄), 5 mmol L⁻¹ e de hexanossulfonato de sódio (C₆H₁₃SO₃Na), e posteriormente o valor de pH da solução foi ajustado para 2,8 com uma solução de H₃PO₄ 10 % e (B) acetonitrila. A leitura da absorbância foi em 195 nm (Bjudak e Rode 1996, Kumar e Kamaluddin, 2012).

5.4.5. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

As amostras foram submetidas ao experimento RPE em banda X (ca. 9 GHz) com 20 G modulação de amplitude e modulação de campo magnético 100 kHz usando um espectrômetro JEOL (JES-PE-3X) em temperatura ambiente. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi utilizado como um marcador *g* e padrão de intensidade da linha. O fator *g* (*g*₂) das linhas do espectro RPE das amostras foi calculado de acordo com a equação 4, onde *g*₁ é o valor do fator *g* do DPPH (*g* = 2,0036), e *B*₁ e *B*₂ são os valores do campo magnético da linha central do DPPH e amostras, respectivamente.

$$g_2 = \frac{g_1 B_1}{B_2} \quad (\text{Equação 4})$$

5.4.6. Análise Textural (BET)

A determinação da área superficial, volume e tamanho do poro foi realizada em um equipamento *High Speed Gas Sorption Analyzer Version 11.02*. As amostras foram previamente tratadas a 120 °C em vácuo por 3h. As medidas foram realizadas na temperatura do N₂ líquido (77,3 K). Os dados foram analisados pelo software NovaWin 11.0. Foram calculados os valores de área superficial de Brunauer, Emmett, e Teller (BET) por meio do gráfico de $P/v(P_0-P)$ versus P/P_0 (equação 5). Onde P_0 é a pressão de equilíbrio, P é a pressão de saturação, v é o volume de gás adsorvido, v_m é o volume da monocamada do gás adsorvido, e C é a constante BET. Os métodos BJH e DH foram usados para o cálculo de tamanho e volume do poro.

$$\frac{P}{v(P_0-P)} = \frac{1}{v_m C} + \frac{(C-1)P}{C v_m P_0} \quad (\text{Equação 5})$$

5.4.7. Espectrometria de massas (ESI-MS)

Foi utilizado um espectrômetro de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) em um MICROMASS® Quattro Micro™ API. O espectro de massas foi obtido com ESI no modo positivo.

5.5. Resultados

5.5.1. Caracterização das goethitas

Os minerais sintéticos foram obtidos a partir de duas vias sintéticas distintas. Figura 2 apresenta os difratogramas de Raios X das amostras G-I e G-II, onde foi confirmada a síntese da fase goethita, e que os materiais são puros e cristalinos.

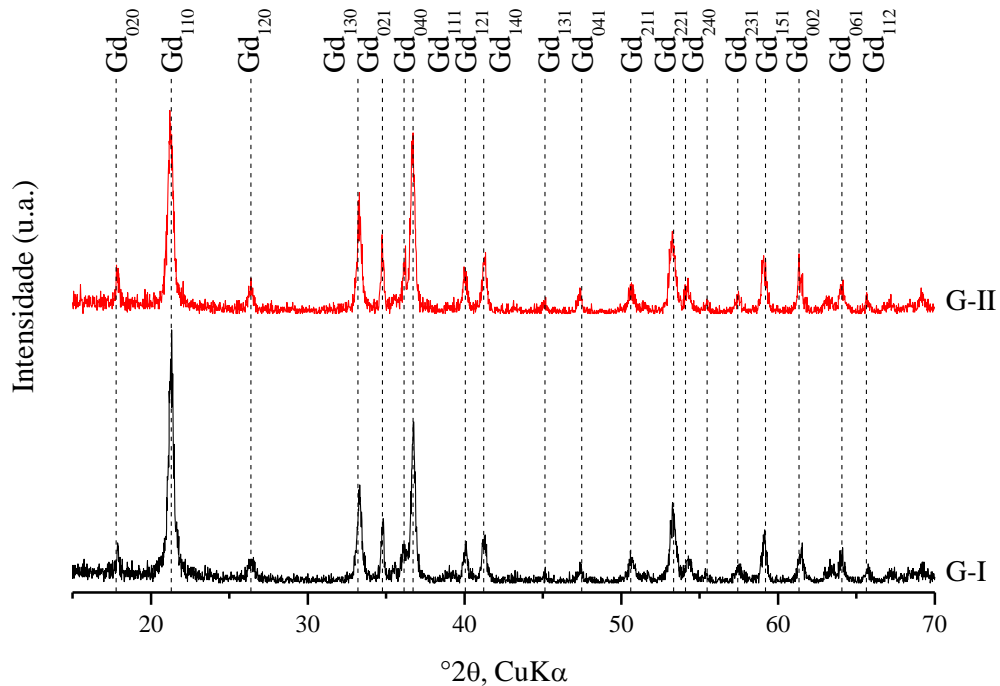


Figura 2. Difratogramas de raios X para materiais a base de goethita obtidas a partir de duas rotas sintéticas distintas: G-I (*linha preta*) e G-II (*linha vermelha*).

Os espectros FT-IR da Goethita G-I e G-II possuem mesma forma na região do infravermelho médio (*mid*) e longínquo (*far*) (Figura 3). Observa-se uma pequena diferença na região do infravermelho longínquo. Para G-I, as bandas são mais estreitas e quatro bandas são observadas nas frequências em 259, 303, 386 e 453 cm^{-1} . O espectro da amostra G-II possui bandas mais largas em um ombro em 348 cm^{-1} . De acordo com Cornell e Schwertmann (2003),

goethita deve ter bandas nas frequências de 263 cm^{-1} e 397 cm^{-1} , atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{O-H})$ e $\nu(\text{Fe-O})$, respectivamente.

Os espectros adquiridos na região do infravermelho médio são similares e não ocorrem diferenças. A banda em 455 e 642 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento $\nu(\text{Fe-O})$. As bandas em 796 e 890 cm^{-1} são atribuídas à deformação $\gamma(\text{Fe-OH})$ fora do plano e no plano, respectivamente. A banda em 3118 cm^{-1} ao estiramento $\nu(\text{O-H})$ (Cornell e Schwertmann, 2003).

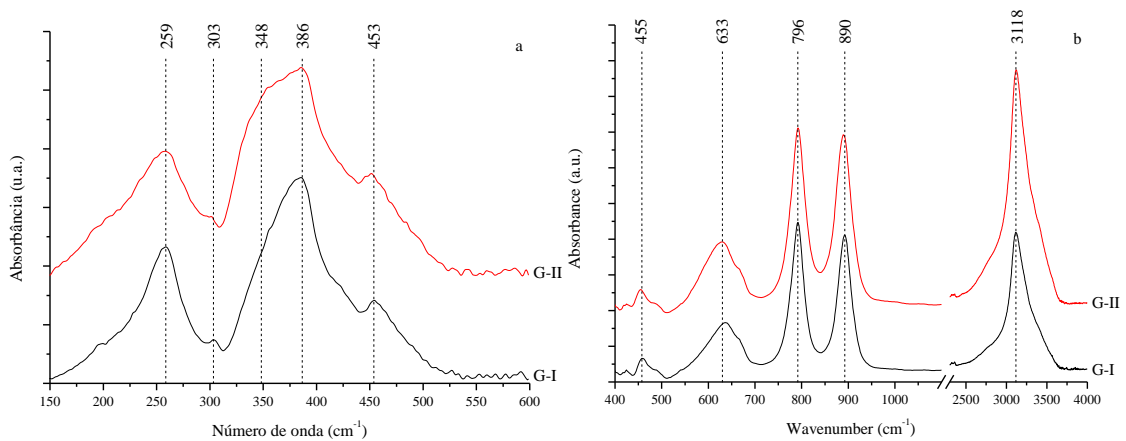
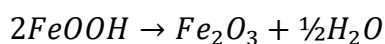


Figura 3. Espectros FT-IR de goethita G-I (linha preta) e G-II (linha vermelha): **a)** far FT-IR; **b)** mid FT-IR.

A análise térmica (Figura 4) para as goethitas apresentou os comportamentos similares, detectam-se dois eventos térmicos. O primeiro evento em 62 e 67 °C para G-I e G-II, respectivamente, é devido a perda de água de hidratação. O segundo evento térmico ocorre em 293 e 298 °C para G-I e G-II, respectivamente, este devido a mudança de fase mineral via desidratação. Os vales obtidos no segundo evento aparentam ser uma somatória de vales. Isto se dá devido a diferentes granulometrias da fase mineral goethita.

Quando aquecidas a temperaturas em torno de $260\text{-}300\text{ °C}$, a fase goethita transforma-se para fase hematita (de Faria e Lopes, 2007). A fase goethita quando aquecida sofre desidratação, o que resulta em uma perda de massa de aproximadamente $10,14\%$. Na desidratação ocorre a perda de $\frac{1}{2}$ mol de água, transformando a fase goethita (FeOOH) em hematita (Fe_2O_3), a qual é a fase termodinamicamente mais estável, nesta temperatura, e de coloração avermelhada (equação 6). Os dois materiais (G-I e G-II) tiveram a perda de massa neste evento de $10,5$ e $11,0\%$, respectivamente.



(Equação 6)

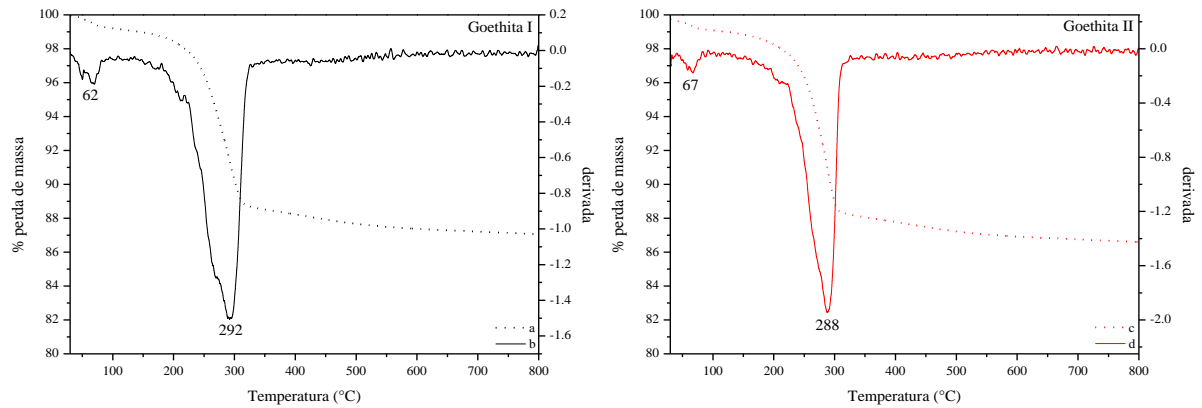


Figura 4. Curvas: a) TG ; b) DTG da Goethita G-I; c) TG ; d) DTG da Goethita G-II.

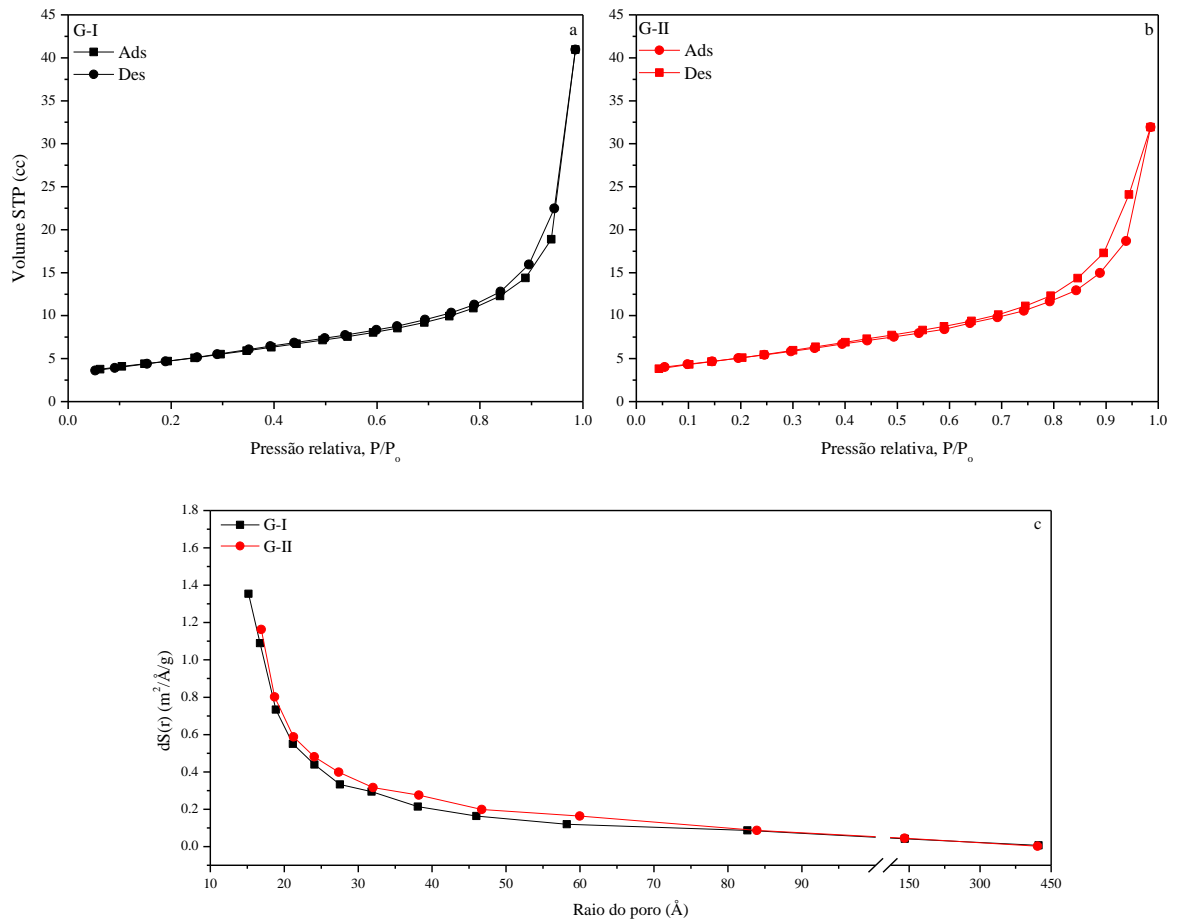


Figura 5. Isotermas de adsorção/desorção de N_2 para: a) Goethita G-I (linha preta); b) Goethita G-II (linha vermelha); c) distribuição de tamanho de poro para Goethitas G-I e G-II.

As isothermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (N_2) foram obtidas com o coeficiente de determinação de 0,999 para ambos casos. A área superficial foi de 35,0 e 37,0 $m^2 g^{-1}$ para goethitas G-I e G-II, respectivamente (Tabela 1). A isoterma de adsorção/dessorção apresentou

um perfil com uma pequena histerese para as duas goethitas (Figura 5). Isto significa que os materiais são de baixa porosidade. Os valores de volume e tamanho do poro foram obtidos pelos métodos BJH e DH mediante da curva de dessorção (Tabela 1). A goethita G-I possui o tamanho de poro de 15,2 Å e a goethita G-II de 16,9 Å. No entanto para o volume do poro, a goethita II apresentou um valor inferior à goethita I, que foi de 0,09 para 0,12 cm³ g⁻¹, respectivamente (Tabela 1). A distribuição do tamanho de poro é similar para os dois materiais (Figura 5), concentrando maior quantidade de poros com raio pequeno.

Tabela 1. Parâmetros obtidos da isoterma de adsorção e dessorção de N₂.

Parâmetros	Método	Goethita G-I	Goethita G-II
Área superficial (m ² g ⁻¹)	BET	35,0	37,0
Volume do poro* (cm ³ g ⁻¹)	BJH	0,123	0,091
	DH	0,120	0,089
Tamanho do poro* (Å)	BJH	15,2	16,9
	DH	15,2	16,9

* Valores obtidos da isoterma de adsorção e dessorção de N₂.

A figura 6 apresenta os espectros RPE para as goethita G-I e G-II, é observada uma linha de ressonância ($g \approx 2$) para G-I. Para a obtenção do espectro foi utilizado um padrão de DPPH, que possui um sinal característico. Deve ser notado que o mineral goethita, em temperatura ambiente, não apresenta sinal RPE, isso ocorre devido ao seu caráter antiferromagnético (Guskos *et al.*, 2002).

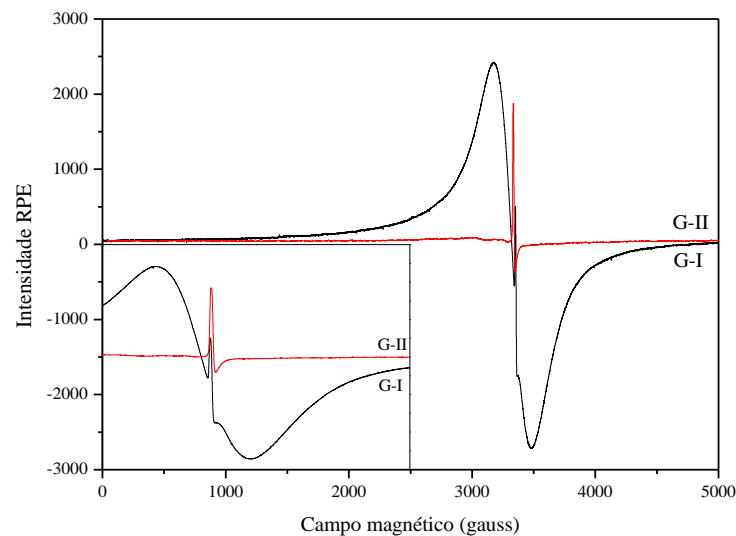


Figura 6. Espectro RPE da goethita G-I (linha preta) e G-II (linha vermelha).

Carneiro *et al.*, (2013) atribuíram este sinal à interação entre Fe^{3+} com cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} . No entanto, esta goethita foi sintetizada em água do mar artificial. No caso da goethita G-I, a síntese foi realizada em água destilada e não deve apresentar essa interação. Por outro lado, este sinal pode ser atribuído às imperfeições que geram momentos não compensados com relação ao spin, na superfície do mineral (Valezi *et al.*, 2017).

5.5.2. Aminoácidos e Peptídeos

De modo a quantificar possíveis peptídeos formados, preparou-se um método de separação cromatográfico para glicina e alanina, e seus respectivos peptídeos. A Figura 7 apresenta o perfil cromatográfico de separação dos aminoácidos e peptídeos.

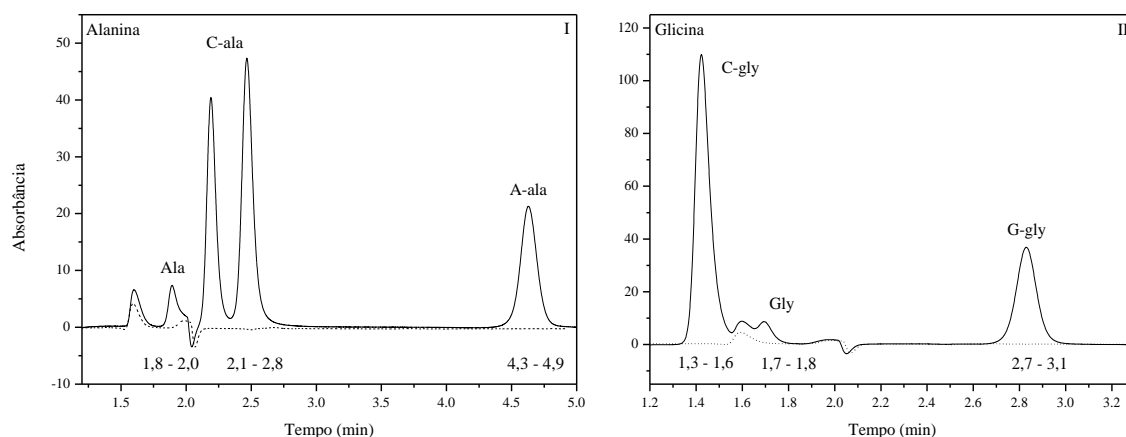


Figura 7. Cromatogramas das misturas de aminoácidos e seus peptídeos para: **I)** Alanina e; **II)** Glicina.

As curvas analíticas foram preparadas nas concentrações de 8, 10, 12, 14, 16 e 18 mg L^{-1} para os aminoácidos, e 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 2,0, 4,0 e 6,0 mg L^{-1} para os peptídeos. As regressões lineares dos aminoácidos glicina e alanina tiveram um coeficiente de determinação linear (R^2) de 0,759 e 0,907 respectivamente. E para os peptídeos C-gly, C-ala, G-gly e A-ala tiveram o R^2 de 0,999, 0,999, 0,998 e 0,998 respectivamente. Na figura 8 são apresentadas as curvas analíticas dos grupos da glicina e alanina. Com esses cromatogramas pode-se concluir que os aminoácidos foram separados dos peptídeos e foi possível sua identificação e quantificação.

A tabela 2 apresenta os valores das massas em unidade de massa atômica (u.m.a.) dos compostos investigados na espectrometria de massas. A análise por espectrometria de massas identifica os compostos pela razão massa carga (m/z). Como o método produz ionização positiva na molécula, acrescentando um íon H^+ , os valores investigados de massa somam uma unidade, por exemplo, Gly-H^+ , $m/z = 76$.

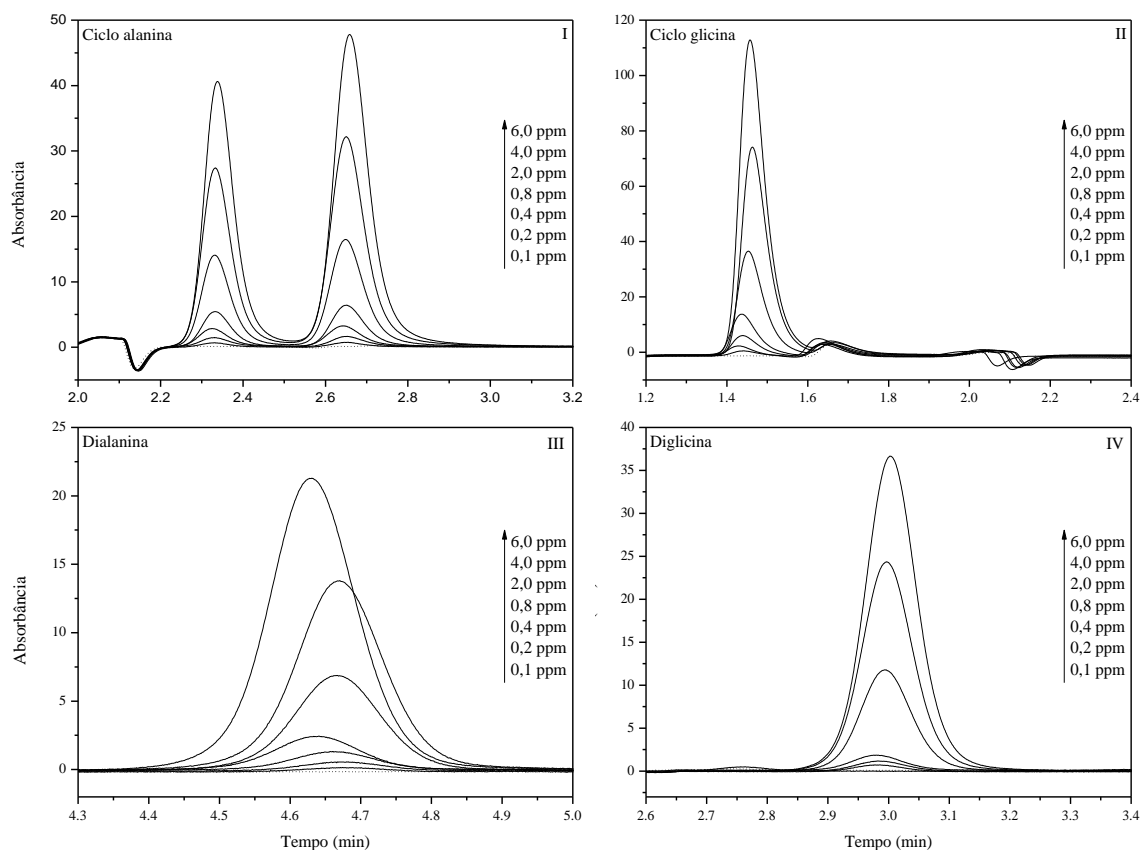


Figura 8. Curvas analíticas dos peptídeos: **I)** C-all; **II)** C-gly; **III)** A-ala e ; **IV)** G-gly.

Tabela 2. Massas dos aminoácidos e peptídeos investigados na espectrometria de massas.

Molécula	Glicina		Alanina	
	Massa	Fórmula	Massa	Fórmula
Aminoácido	75,03204	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	89,04768	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$
Ciclo peptídeo	114,04294	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$	142,07424	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$
Dipeptídeo	132,05351	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	160,08481	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$
Tripeptídeo	189,07498	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$	231,12193	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$

Neste sentido, as amostras foram injetadas no espectrômetro de massas para identificação dos picos moleculares presentes. No primeiro quadrupolo ocorre a protonação e formação da carga positiva das moléculas. E em seguida, no segundo quadripolo um excesso de energia é aplicada e ocorre a fragmentação de um pico do íon molecular previamente selecionado. No terceiro quadripolo, os picos moleculares gerados da fragmentação são identificados e assim é obtido um novo espectro de massas. Como a fragmentação de um composto é reproduzível, ou seja, não aleatório, a identificação do pico do íon molecular inicialmente selecionado se torna

mais favorável. Essa estratégia é adotada neste estudo para comprovar se um pico do íon molecular previamente atribuído a um peptídeo realmente é devido ao mesmo. Sendo assim, se um suposto peptídeo, após a fragmentação gera um pico de mesma razão m/z do aminoácido de que é formado, se obtém a confirmação do composto.

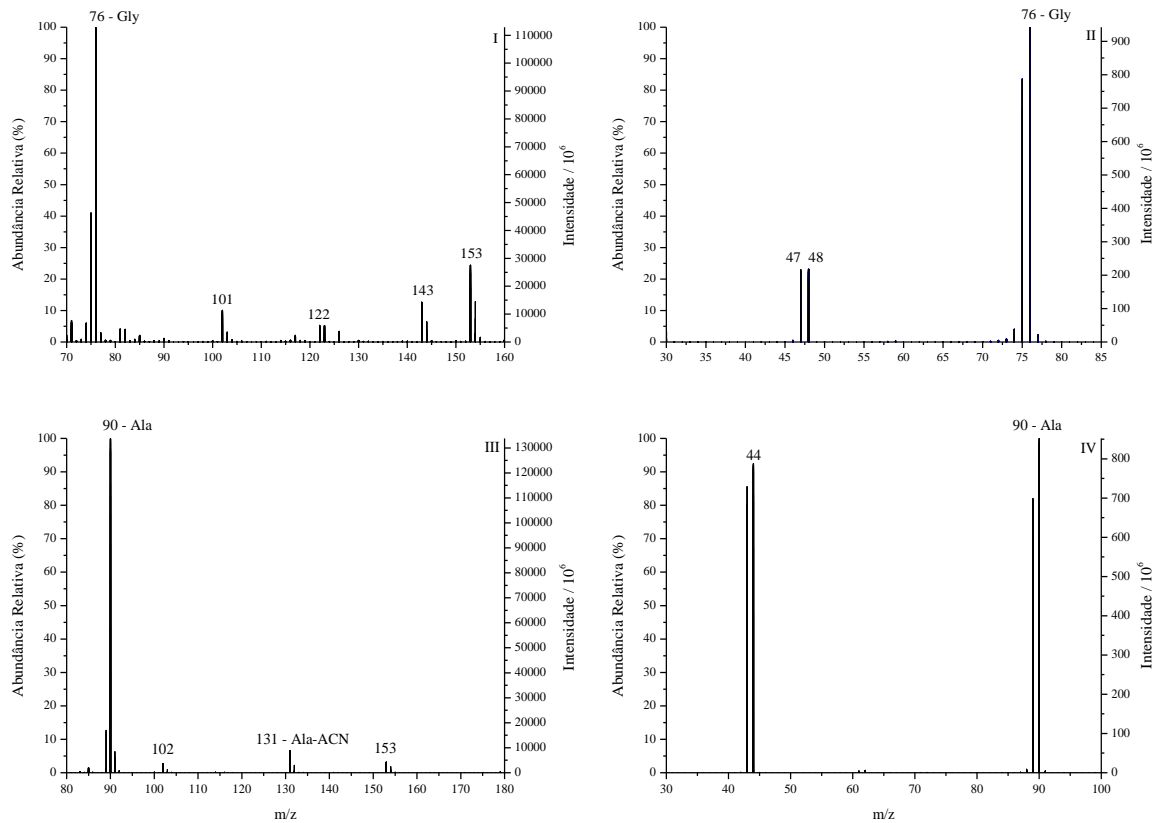


Figura 9. Espectros de massas de: **I)** glicina; **III)** alanina. Fragmentação do pico com m/z : **II)** 76; **IV)** 90.

Na figura 9 são apresentados os espectros de massas dos aminoácidos glicina e alanina e os espectros de massas da fragmentação dos picos em 76 e 90 m/z . O espectro de massas da solução de glicina apresenta o pico de maior intensidade em 76, razão m/z atribuída a Gly-H⁺, e também outros picos em 101, 122, 143 e 153 m/z . Após a fragmentação do pico em 76, observam-se os picos em 47 e 49 m/z .

O espectro de massas da solução de alanina apresenta o pico de maior intensidade em 90 m/z atribuído a Ala-H⁺, mais outros picos em 102, 153 e 131. Este último pode ser atribuído a uma associação de Ala com acetonitrila (ACN) que é utilizada no preparo das soluções para injeção. Esse mesmo comportamento acontece em outras amostras com glicina, onde se tem o pico em 117 m/z , resultado da associação de Gly-ACN.

5.5.3. Amostras controle

Foram testadas amostras controle, sem a fase mineral, de modo a investigar a estabilidade dos aminoácidos submetidos aos tratamentos A, B e C. Analisaram-se os sólidos obtidos por espectroscopia no infravermelho (FT-IR). As amostras de alanina não apresentaram diferenças no espectro (Figura 10-I), o que significa que quando aquecida a 90 °C por 10 dias, alanina não se altera e mantém sua estrutura química. Por outro lado, para glicina, observam-se algumas alterações no espectro FT-IR. Pontua-se que a glicina apresenta polimorfismo no estado sólido. As fases mais comuns são α , β e γ . O tipo de fase depende do método de cristalização utilizado. A detecção de cada fase é realizada por FT-IR. O reagente utilizado nos ensaios, sem tratamento prévio, apresenta bandas características às fases α e γ . Mesmas fases observadas quando a glicina é submetida ao tratamento A (apenas aquecimento). Quando glicina é solubilizada em água e posteriormente aquecida, (tratamentos B e C) ocorre a formação da fase α , apenas (Boldyreva *et al.*, 2003, Varshney *et al.*, 2007). Quando submetida aos tratamentos B e C, as bandas em 930 e 1154 cm^{-1} desaparecem. Essas frequências são atribuídas aos movimentos rocking $\rho(\text{CH}_2)$ e $\rho(\text{NH}_3)$, respectivamente, e são características da fase γ . Também é observado a formação da banda em 1606 cm^{-1} , atribuída à deformação assimétrica $\delta_a(\text{NH}_3)$ da fase α da glicina (Figura 7-II).

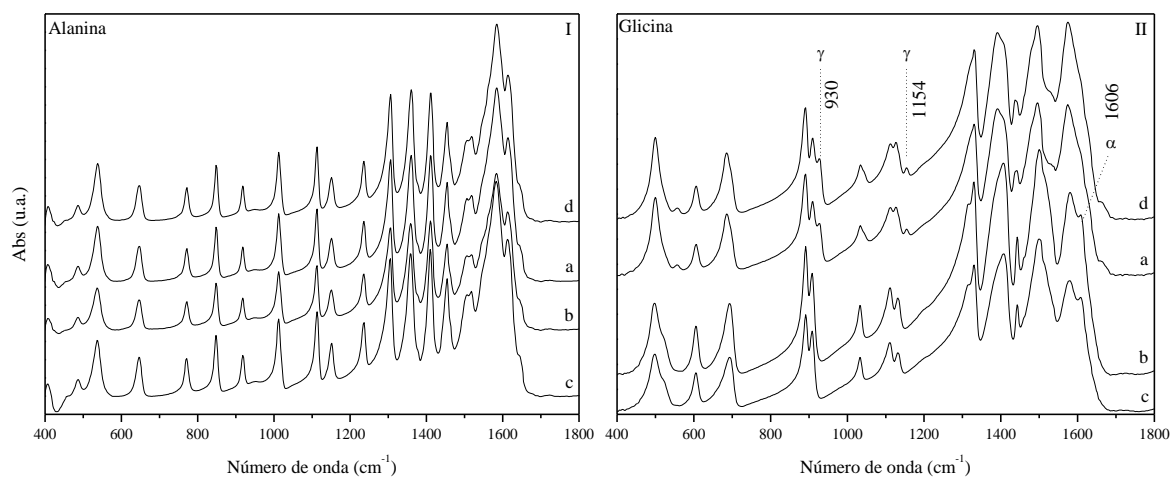


Figura 10. Espectros FT-IR dos aminoácidos: **I)** alanina e; **II)** glicina. Nos tratamentos: **a)** A; **b)** B; **c)** C; **d)** sem tratamento prévio.

Pela análise cromatográfica (HPLC) não se detectou nenhum pico relativo à formação de peptídeos e/ou produtos de degradação (Figura 11). Esses resultados estão de acordo com os obtidos pela espectroscopia FT-IR. O que significa que os aminoácidos submetidos aos tratamentos A, B e C não reagem do modo a formar peptídeos.

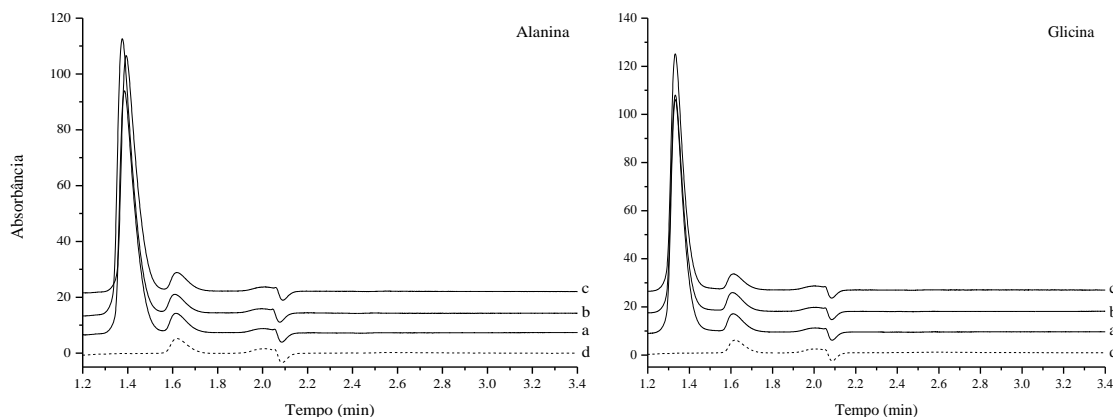


Figura 11. Cromatogramas dos controles de alanina e glicina nos tratamentos: **a)** A; **b)** B; **c)** C e **d)** branco.

As amostras controles para os minerais (sem fase orgânica) não apresentaram diferenças no espectro FT-IR quando aquecidos a 90 °C por 10 dias (Figura 12). Os minerais G-I e G-II se conservam como goethita.

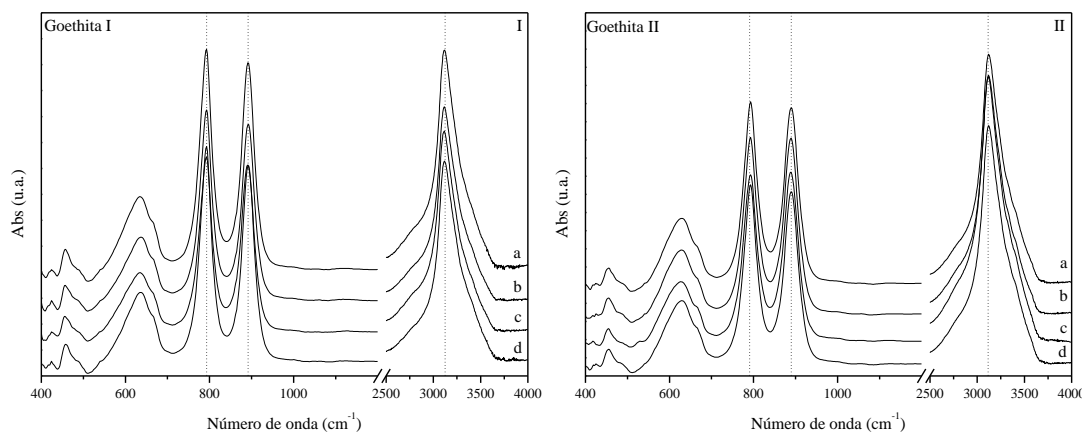


Figura 12. Espectros FT-IR de: **I)** **a)** goethita I submetida ao tratamento A; **b)** goethita I submetida ao tratamento B; **c)** goethita I submetida ao tratamento C; **d)** goethita I sem tratamento; **II)** **a)** goethita II com glicina submetida ao tratamento A; **b)** goethita II com glicina submetida ao tratamento B; **c)** goethita II com glicina submetida ao tratamento C; **d)** goethita II sem tratamento.

No entanto, são observadas algumas mudanças nos espectros na região de 150 a 600 cm^{-1} (Far). A goethita G-I apresenta um deslocamento de duas bandas quando submetida aos três tratamentos. A primeira banda desloca de 385 para 377 cm^{-1} e a segunda de 257 para 253 cm^{-1} (Figura 13-I). O mesmo deslocamento para números de onda menores, de 257 para 248 cm^{-1} , acontece para a goethita II, mas apenas no método B (Figura 13-II). Deve ser notado que a frequência em 630 cm^{-1} é sensível à cristalinidade e morfologia das partículas, e os dados não apresentam deslocamento desta banda. Entretanto, os resultados, na região do infravermelho

longínquo (*Far*), não indicam modificação no mineral, pois a banda nesta região é insensível à forma e cristalinidade de partícula (Cornell e Schwertmann, 2003).

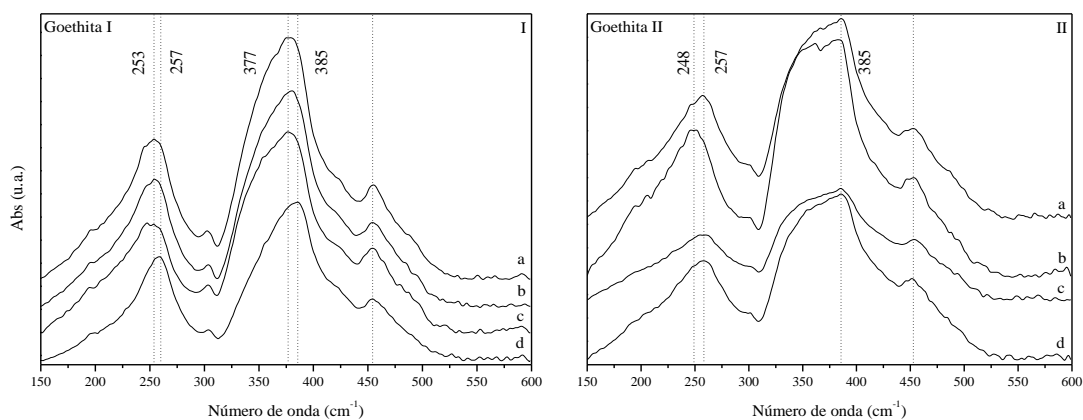


Figura 13. Espectros Far FT-IR de: **I) a)** goethita I submetida ao tratamento A; **b)** goethita I submetida ao tratamento B; **c)** goethita I submetida ao tratamento C; **d)** goethita I sem tratamento; **II) a)** goethita II com glicina submetida ao tratamento A; **b)** goethita II com glicina submetida ao tratamento B; **c)** goethita II com glicina submetida ao tratamento C; **d)** goethita II sem tratamento.

No entanto, é observado algumas diferenças no espectro RPE para G-I (Figura 14). A intensidade relativa do sinal RPE diminui de 1,00 para G-I sem tratamento prévio para 0,56, 0,53 e 0,76 quando submetido aos tratamentos A, B e C, respectivamente, mesmo assim o fator g não muda ($g \sim 2$). Este resultado indica que há modificação na vizinhança do Fe (III). Portanto, a diminuição da intensidade pode ser explicada pela reorganização dos íons Fe (III), diminuindo os defeitos do material. Para goethita G-II não são observadas mudanças devido à falta de sinal RPE.

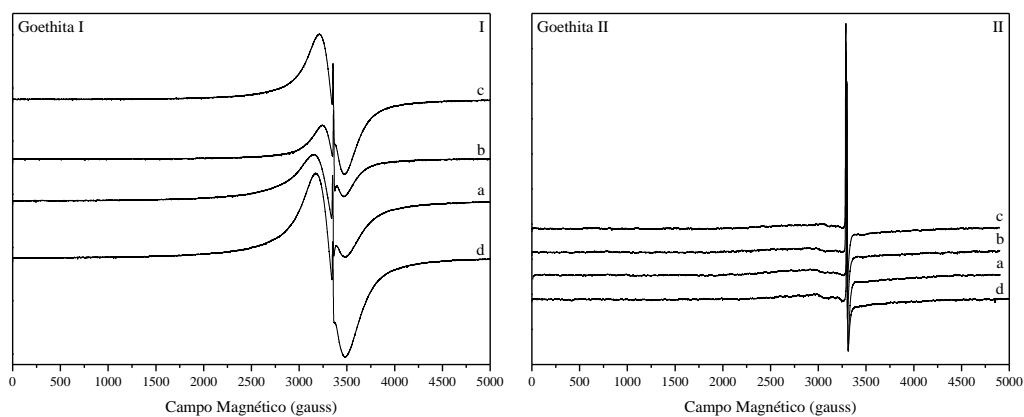


Figura 14. Espectros RPE de: **I) a)** goethita I submetida ao tratamento A; **b)** goethita I submetida ao tratamento B; **c)** goethita I submetida ao tratamento C; **d)** goethita I sem tratamento; **II) a)** goethita II

com glicina submetida ao tratamento A; **b)** goethita II com glicina submetida ao tratamento B; **c)** goethita II com glicina submetida ao tratamento C; **d)** goethita II sem tratamento.

Realizaram-se os procedimentos de extrações com os minerais G-I e G-II sem tratamento prévio. Estes extratos foram analisados por cromatografia (Figura 15) e espectrometria de massas (Figura 16) para garantir que nenhum outro composto seja extraído, como amostras controles. Nenhum composto foi identificado por estas técnicas.

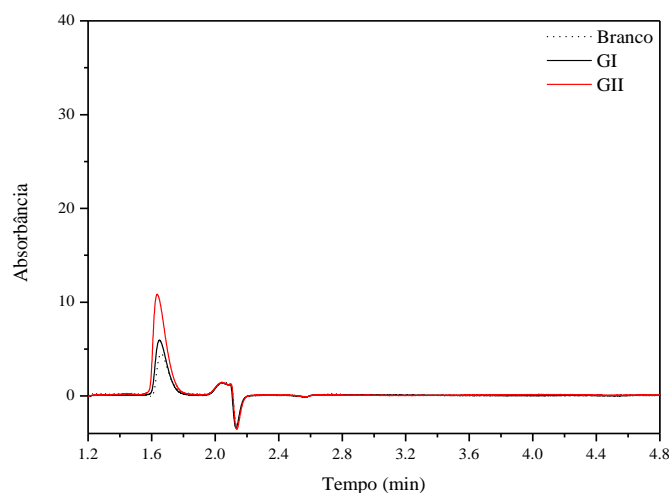


Figura 15. Curva cromatográfica dos extratos controles de G-I e G-II.

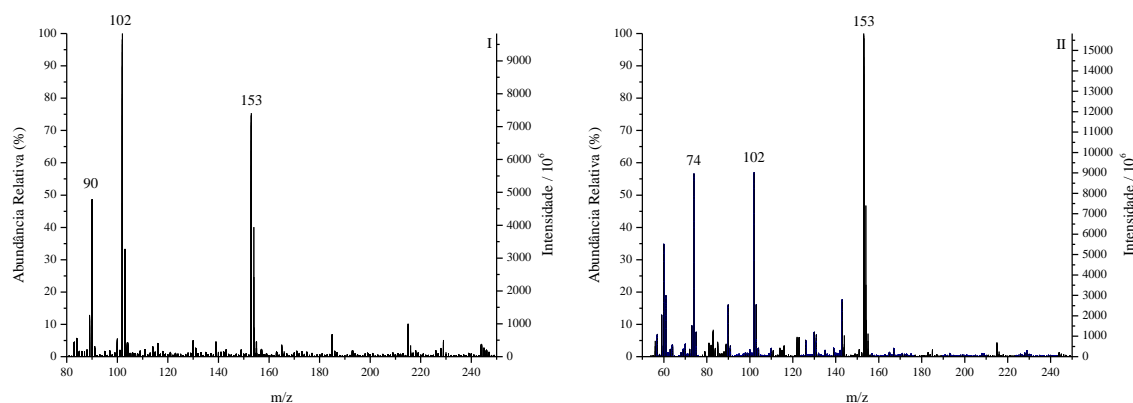


Figura 16. Espectros de massas dos extratos das amostras controle de: **I)** G-I; **II)** G-II.

A figura 16 apresenta os espectros de massa dos extratos de controle das goethitas I e II. Onde aparecem os picos em 90, 102 e 153 para goethita G-I e 74, 102 e 153 para goethita G-II. Deve-se ressaltar que a intensidade do sinal desses picos é baixa quando comparada com os espectros obtidos das soluções com aminoácidos. Por fim, foram preparadas amostras controles de minerais mais adição de aminoácidos no tratamento A, por mistura mecânica, e tratamento B pela adição da solução de aminoácidos e posterior liofilização. As amostras sem aquecimento

resultam em uma somatória dos espectros FT-IR do mineral mais do aminoácido. Portanto, pode-se assumir que a mera mistura de ambos não resulta na formação de peptídeos.

5.5.4. Ensaio de formação de peptídeos

Os sólidos obtidos dos experimentos com goethita (I e II) e os aminoácidos (glicina e alanina) submetidos aos tratamentos A, B e C não apresentaram formações de bandas novas ou deslocamentos nos espectros FT-IR (Figura 17). É observada uma somatória dos espectros FT-IR dos sólidos obtidos do controle de aminoácidos com os espectros FT-IR das goethitas I e II.

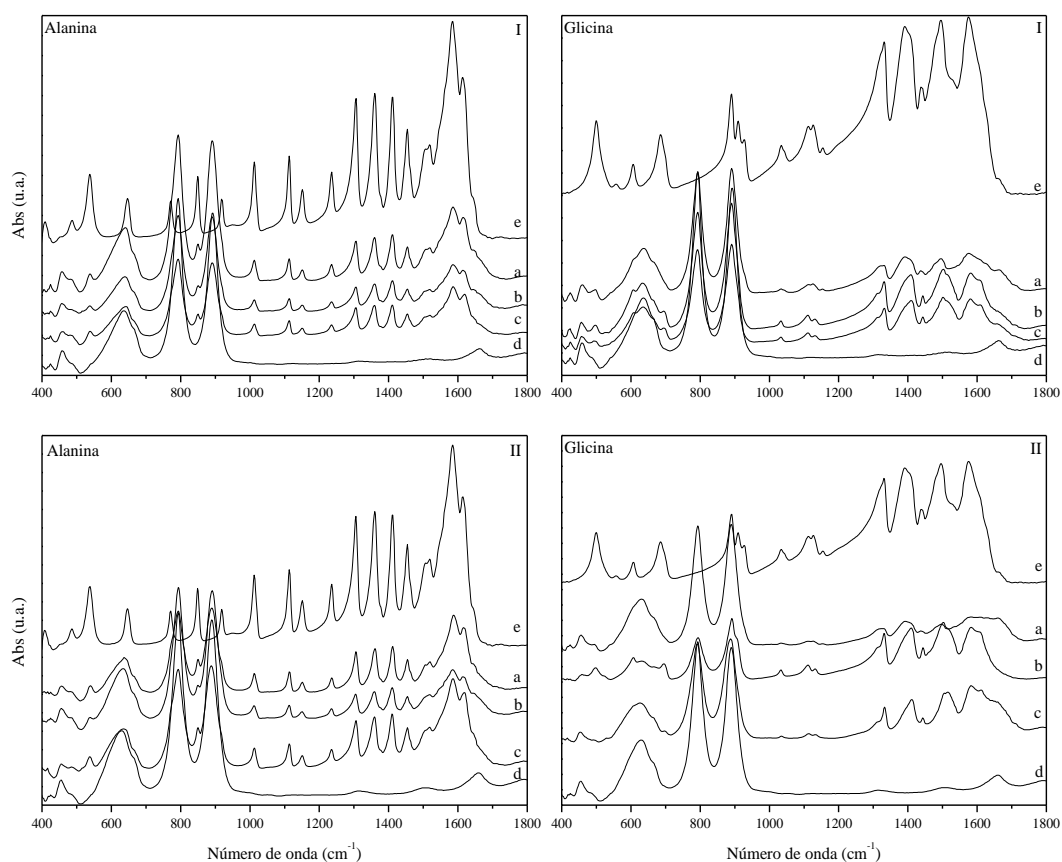


Figura 17. Espectros FT-IR das amostras com: **I)** goethita I; **II)** goethita II. **a)** goethita com aminoácido submetida ao tratamento A; **b)** goethita com aminoácido submetida ao tratamento B; **c)** goethita com aminoácido submetida ao tratamento C; **d)** goethita sem tratamento; **e)** aminoácido sem tratamento.

Nos espectros *Far*-FT-IR dessas mesmas amostras (Figura 18) aparecem pequenas modificações. No caso do experimento com goethita G-I e glicina, a banda em 385 cm⁻¹ aparece em 386, 388 e 389 cm⁻¹ para as amostras submetidas aos métodos A, B e C respectivamente. Quando o experimento é realizado com goethita II, a banda 258 cm⁻¹ é deslocada para 265 cm⁻¹ para o método B, e a banda em 385 cm⁻¹ é deslocada para 390, 391 388 cm⁻¹ para as amostras

submetidas aos métodos A, B e C respectivamente. Nos casos dos experimentos com alanina também são observados deslocamentos. Quando em Goethita G-I, a banda em 385 é deslocada para 388 cm^{-1} . Quando em goethita G-II a banda em 257 desloca para 262 cm^{-1} e 385 para 391 cm^{-1} . A banda que aparece em 538 cm^{-1} pode ser atribuída à mesma frequência na região do infravermelho médio da alanina sem tratamento.

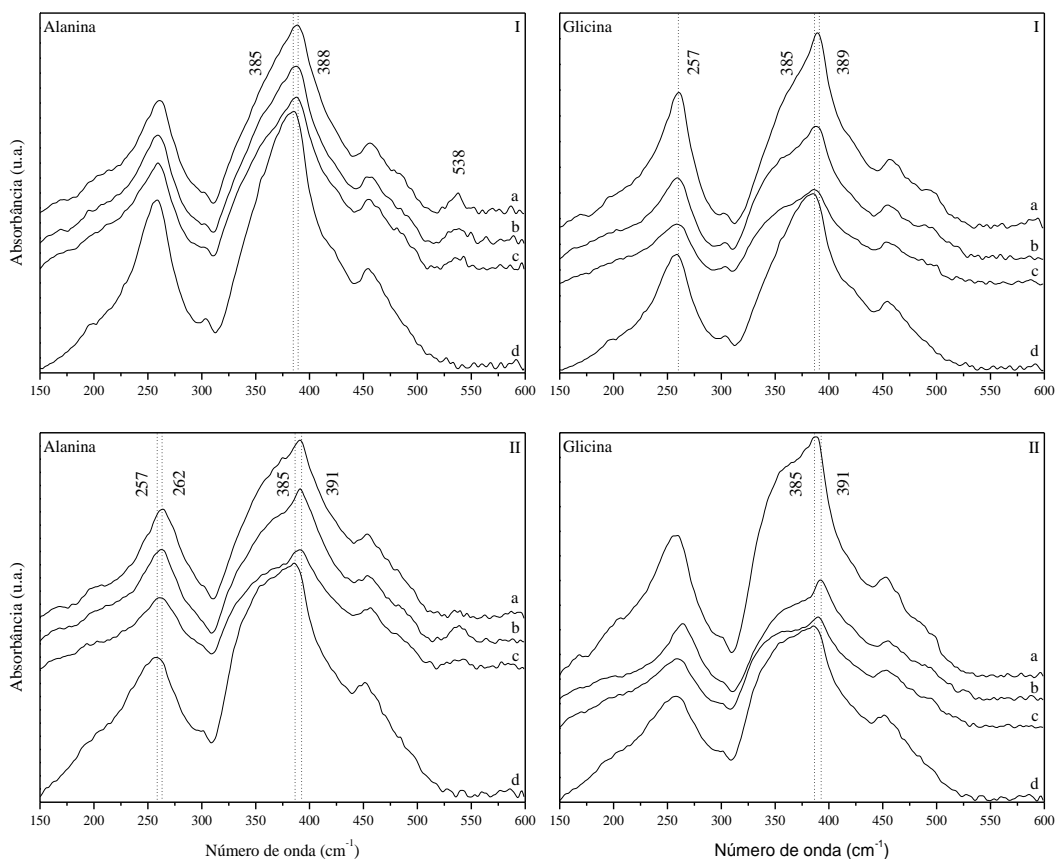


Figura 18. Espectros *Far FT-IR* das amostras com: **I)** goethita I; **II)** goethita II. **a)** goethita com aminoácido submetida ao tratamento A; **b)** goethita com aminoácido submetida ao tratamento B; **c)** goethita com aminoácido submetida ao tratamento C; **d)** goethita sem tratamento.

Os experimentos com goethita G-I apresentam diminuição na intensidade do sinal RPE. No caso com glicina a intensidade relativa diminui de 1,00 para 0,53, 0,33 e 0,35 nos tratamentos A, B e C, respectivamente. Com a alanina também ocorre diminuição do sinal RPE para o método A de 1,00 para 0,15. Para os métodos B e C ocorre o desaparecimento do sinal (Figura 19). Os experimentos com goethita II não apresentam sinal RPE, da mesma forma que G-II não possui sinal.

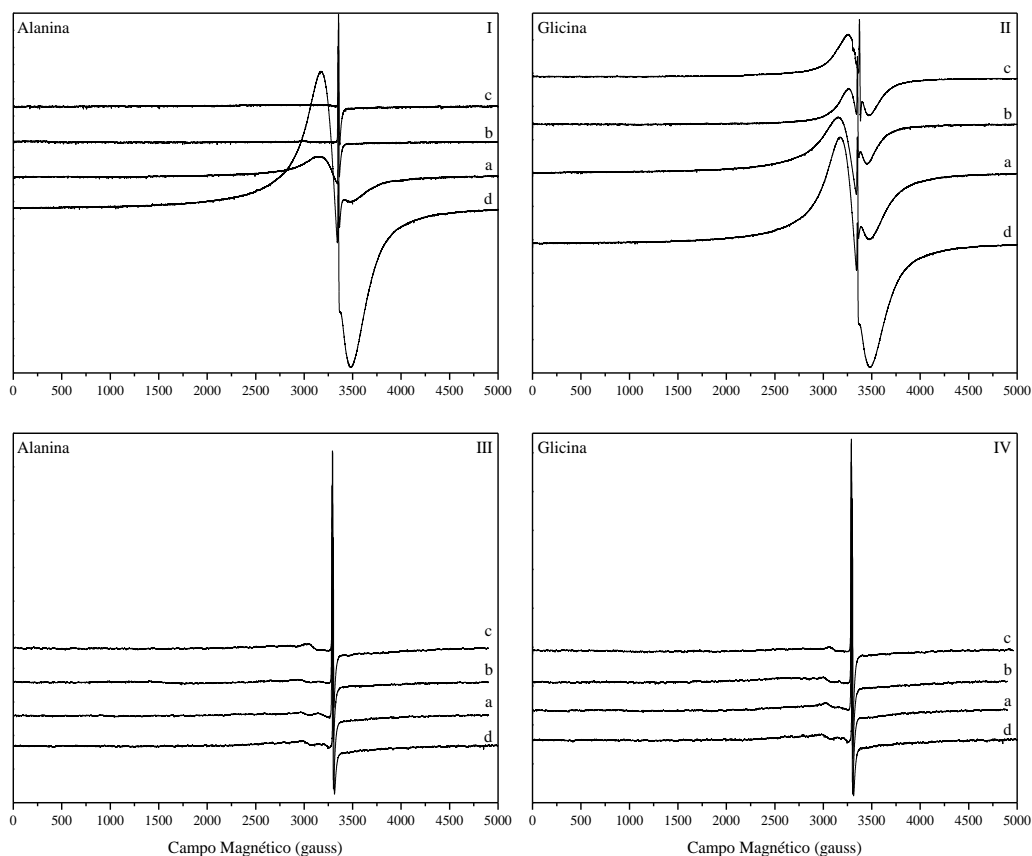


Figura 19. Espectros RPE das amostras de: **I)** alanina com G-I; **II)** glicina com G-II; **III)** alanina com G-I; **IV)** glicina com G-II. Espectros RPE das amostras submetidas aos **a)** tratamento A; **b)** tratamento B; **c)** tratamento C; **d-I, III)** alanina sem tratamento; **d-II, IV)** goethita sem tratamento

De modo a analisar os possíveis produtos de polimerização termal, extratos foram realizados com água ultra pura. Os extratos foram filtrados, congelados e liofilizados. Nos espectros FT-IR da matriz mineral após a extração dos aminoácidos observam-se as bandas relativas à goethita. E para ambos extratos dos aminoácidos Gly e Ala, apenas é observada as bandas relativas aos aminoácidos, demonstrando uma extração bem-sucedida (Figuras 20 e 21). Quando são analisados os espectros FT-IR dos sobrenadantes liofilizados não é observado bandas que indiquem formação de ligação peptídica.

Os espectros FT-IR dos extratos de glicina apresentaram mudanças com o deslocamento da banda de 1033 para 1040 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico $\nu_a(\text{CCN})$, devido a formação da fase β e γ (Pyne *et al.*, 2001; Varshney *et al.*, 2007) (Anexo III). No caso da alanina, não há ocorrência de deslocamentos ou novas bandas no espectro FT-IR.

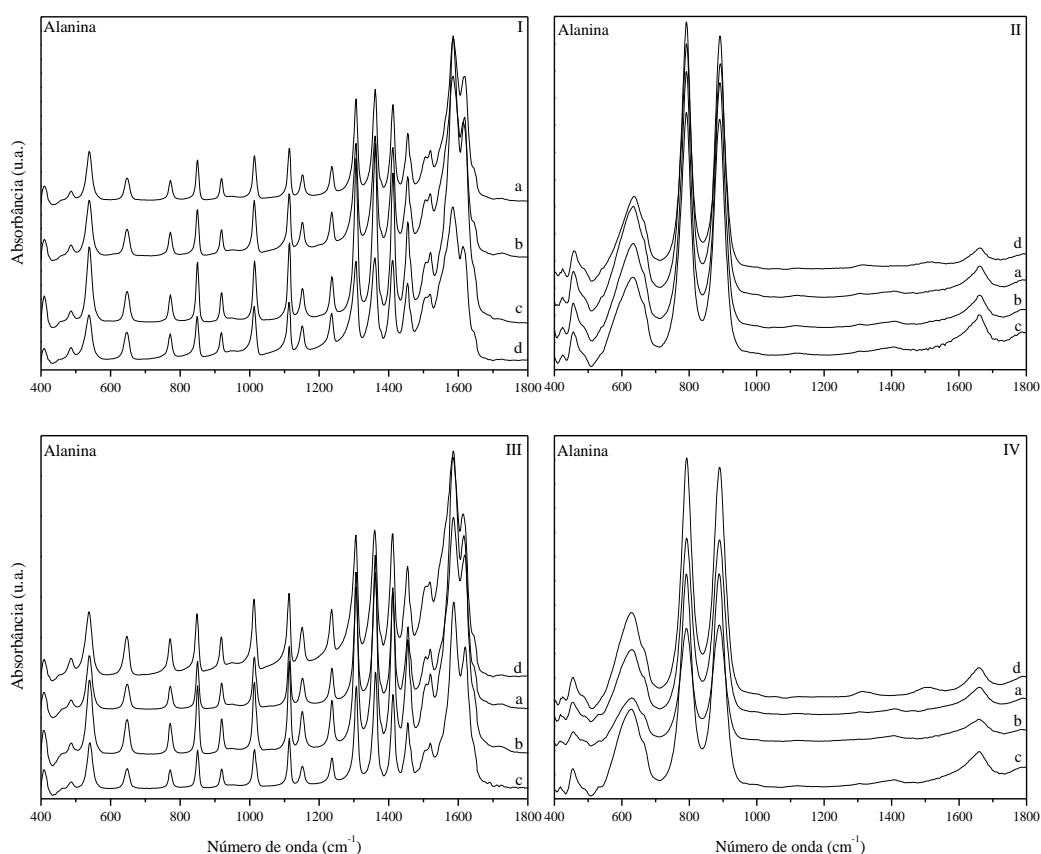


Figura 20. Espectros FT-IR das amostras após extração em: **I e II**) G-I; **III e IV**) G-II. Quadrantes **I e III** são referentes aos sobrenadantes e **II e IV** aos sólidos. Espectros **a**) tratamento A; **b**) tratamento B; **c**) tratamento C; **d-I, III**) alanina sem tratamento; **d-II, IV**) goethita sem tratamento

As fases extratoras foram injetadas no cromatógrafo (HPLC) e comparadas como soluções padrões de aminoácidos glicina e alanina, e de peptídeos glicina e alanina anidra, e diglicina e dialanina. A figura 22 apresenta o perfil cromatográfico dos extratos obtidos. Deve ser pontuado que a alanina anidra (C-ala) possui dois picos no cromatograma. Este comportamento é devido à composição do padrão, uma mistura de D, L e meso alanina anidra.

Nos experimentos com mineral e alanina foi identificado a formação do peptídeo C-ala para goethita G-I e G-II em todo os tratamentos, e o dipeptídeo A-ala para G-I e G-II nos tratamentos A e C. A tabela 3 apresenta a quantidade de peptídeos formados. Esses valores indicam a concentração em mg L^{-1} como média \pm erro padrão da média. O valor é relativo à quantidade de aminoácido que reagiu e formou os peptídeos.

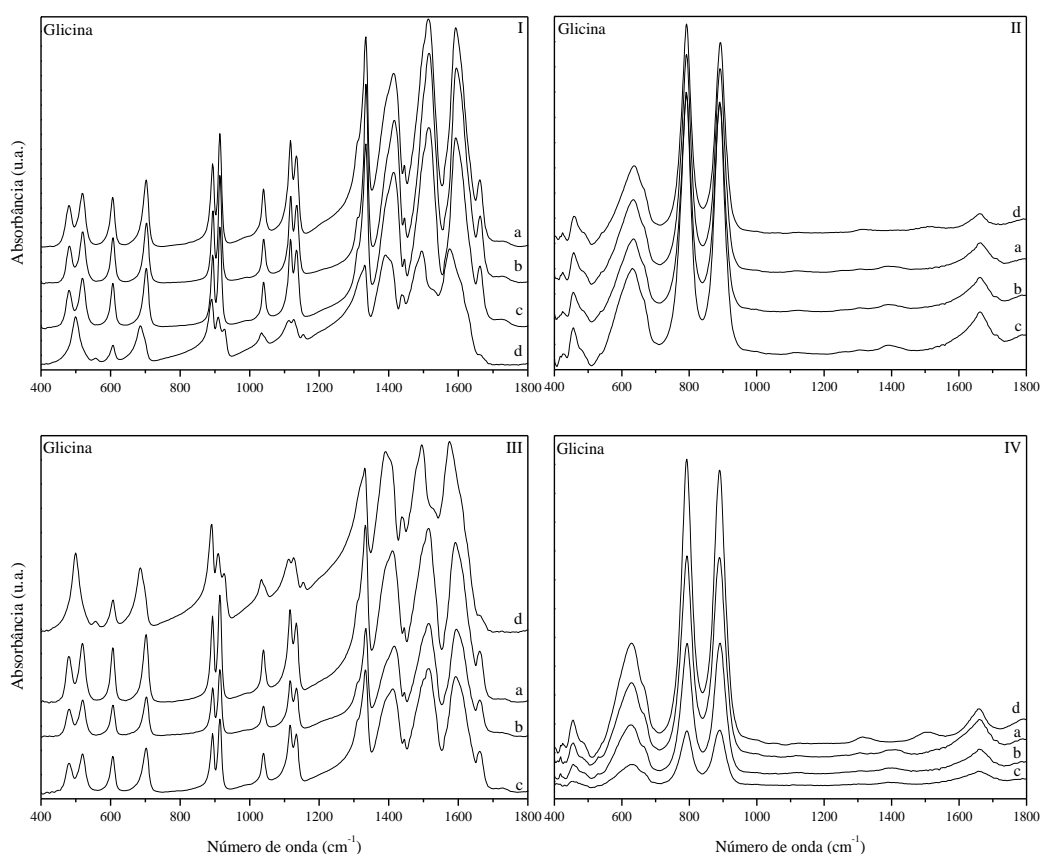


Figura 21. Espectros FT-IR das amostras após extração em: **I e II**) G-I; **III e IV**) G-II. Quadrantes **I e III** são referentes aos sobrenadantes e **II e IV** aos sólidos. Espectros **a**) tratamento A; **b**) tratamento B; **c**) tratamento C; **d-I, III**) glicina sem tratamento; **d-II, IV**) goethita sem tratamento.

A quantidade de C-ala no tratamento C para G-I e G-II foi de 1,08 e 1,05 mg L⁻¹, respectivamente, e estatisticamente iguais. As quantidades de C-ala nos tratamentos A e B para G-I e G-II foram estatisticamente iguais. Mas, estes dois grupos são estatisticamente diferentes, portanto, pode-se inferir que o tratamento C resulta em maior rendimento na formação do peptídeo C-ala. A quantidade de A-ala para os tratamentos A e C são estatisticamente iguais. Nos cromatogramas com os extratos de glicina são observados picos relativos à C-gly para G-I e G-II submetidas ao tratamento C. Também são observados picos que são atribuídos à G-gly para G-I e G-II submetido ao tratamento C. De modo a confirmar os produtos formados, os extratos foram injetados em um espectrômetro de massas (ESI-MS).

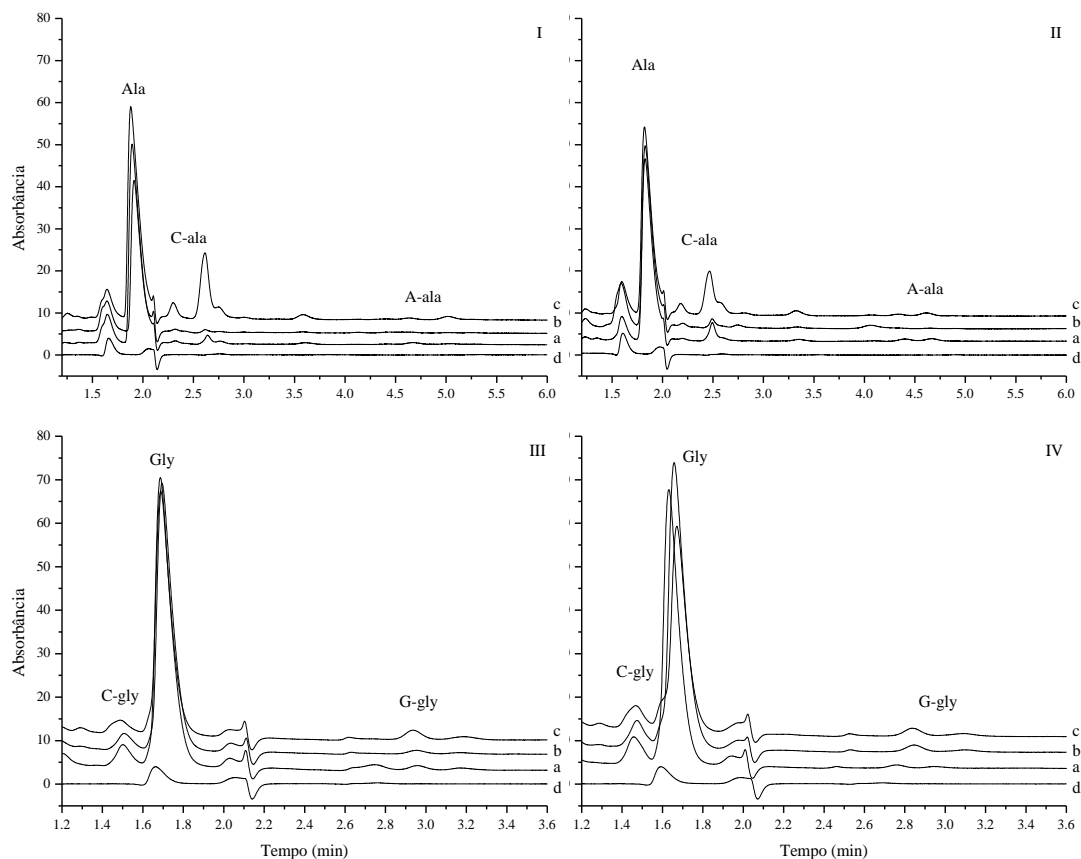


Figura 22. Cromatogramas das amostras após extração em Goethita: **I e III)** G-I; **II e IV)** G-II. Cromatogramas das amostras nos tratamentos: **a)** A; **b)** B; **c)** C; **d)** branco.

Os extratos foram injetados no espectrômetro de massas (Figuras 23 – 25). No primeiro quadrupolo ocorre a protonação e identificação da molécula. No segundo quadrupolo, um excesso de energia é aplicado resultando na fragmentação da molécula. Os fragmentos formados são identificados no terceiro quadrupolo. Como a fragmentação de um composto possui um padrão reproduzível, ou seja, não aleatório, é possível garantir sua identificação.

Os picos dos íons moleculares detectados por fragmentação foram investigados. Os picos 117 e 131 m/z nos espectros de Gly e Ala, respectivamente, são devido à associação desses aminoácidos com acetonitrila (ACN). A fragmentação desses picos resulta em outros picos com 76 e 90 m/z , respectivamente, valores relativos aos aminoácidos. A diferença entre o pico identificado e o pico resultante da fragmentação é de 41, o valor da massa molecular de ACN. O espectro de massa da fragmentação dos picos em 133, 143 e 161 m/z são evidências dos peptídeos G-gly, C-ala e A-ala, respectivamente. A fragmentação do íon molecular em 133 m/z gera um pico em 76 m/z (valor de Gly). A fragmentação dos íons moleculares 143 e 161 resultam no pico em 90 m/z , valor atribuído à alanina.

Nos experimentos com o mineral e alanina foi detectado um pico em 143 m/z, atribuído ao C-ala-H⁺, mesmo peptídeo detectado por cromatografia. O pico em 161 m/z, atribuído ao A-ala-H⁺, é detectado apenas nos tratamentos A e C para as goethitas G-I e G-II, e no tratamento B apenas em goethita G-I. No entanto, neste ensaio por cromatografia, este peptídeo não é observado, indicando sua baixa concentração. Nos experimentos com Gly em goethitas G-I e G-II submetidas ao tratamento A, não foi detectada a formação de peptídeos. Mesmo comportamento com Gly em goethita G-I nos tratamentos B e C. Por outro lado, nos experimentos com goethita G-II submetida aos tratamentos B e C é detectada a formação de peptídeo G-gly. As quantidades deste dipeptídeo nos tratamentos B e C foram estatisticamente iguais.

Nos espectros de massas dos experimentos de Gly e goethitas é observada apenas a formação de peptídeos para a goethita G-II e nos tratamentos B e C. Nestes, ocorre o pico em 133 m/z, relativo ao peptídeo G-gly. Mesmo que na análise cromatográfica (HPLC), o composto C-gly tenha sido detectado, este não foi considerado por não ter sido detectado na espectrometria de massas. Portanto, C-gly foi descartado como um produto de reação. Mesmo procedimento foi realizado para os experimentos com G-I.

Tabela 3. Quantidade de peptídeos formados.

Aminoácido	Tratamento	Goethita	Peptídeo anidro	Dipeptídeo
Gly	A	G-I	-	-
		G-II	-	-
	B	G-I	-	-
		G-II	-	0,27 ± 0,04 ^a (0,24 %)
	C	G-I	-	-
		G-II	-	0,41 ± 0,12 ^a (0,37 %)
Ala	A	G-I	0,25 ± 0,02 ^b (0,23 %)	0,16 ± 0,03 ^a (0,14 %)
		G-II	0,37 ± 0,03 ^b (0,34 %)	0,13 ± 0,01 ^a (0,11 %)
	B	G-I	0,21 ± 0,06 ^b (0,19 %)	-
		G-II	0,17 ± 0,04 ^b (0,15 %)	-
	C	G-I	1,08 ± 0,27 ^a (0,97 %)	0,18 ± 0,09 ^a (0,16 %)
		G-II	1,05 ± 0,27 ^a (0,95 %)	0,17 ± 0,03 ^a (0,15 %)

Valores das concentrações como média ± erro padrão da média (mg L⁻¹). Valores entre parênteses indicam a porcentagem de peptídeos formados (%), relativa à quantidade inicial de aminoácidos. O número de experimentos foi de n=4. Média com letras minúsculas, nas colunas de cada grupo de aminoácido, diferem para o teste Tukey (p<0,05). Nenhuma comparação estatística foi realizada para diferentes compostos.

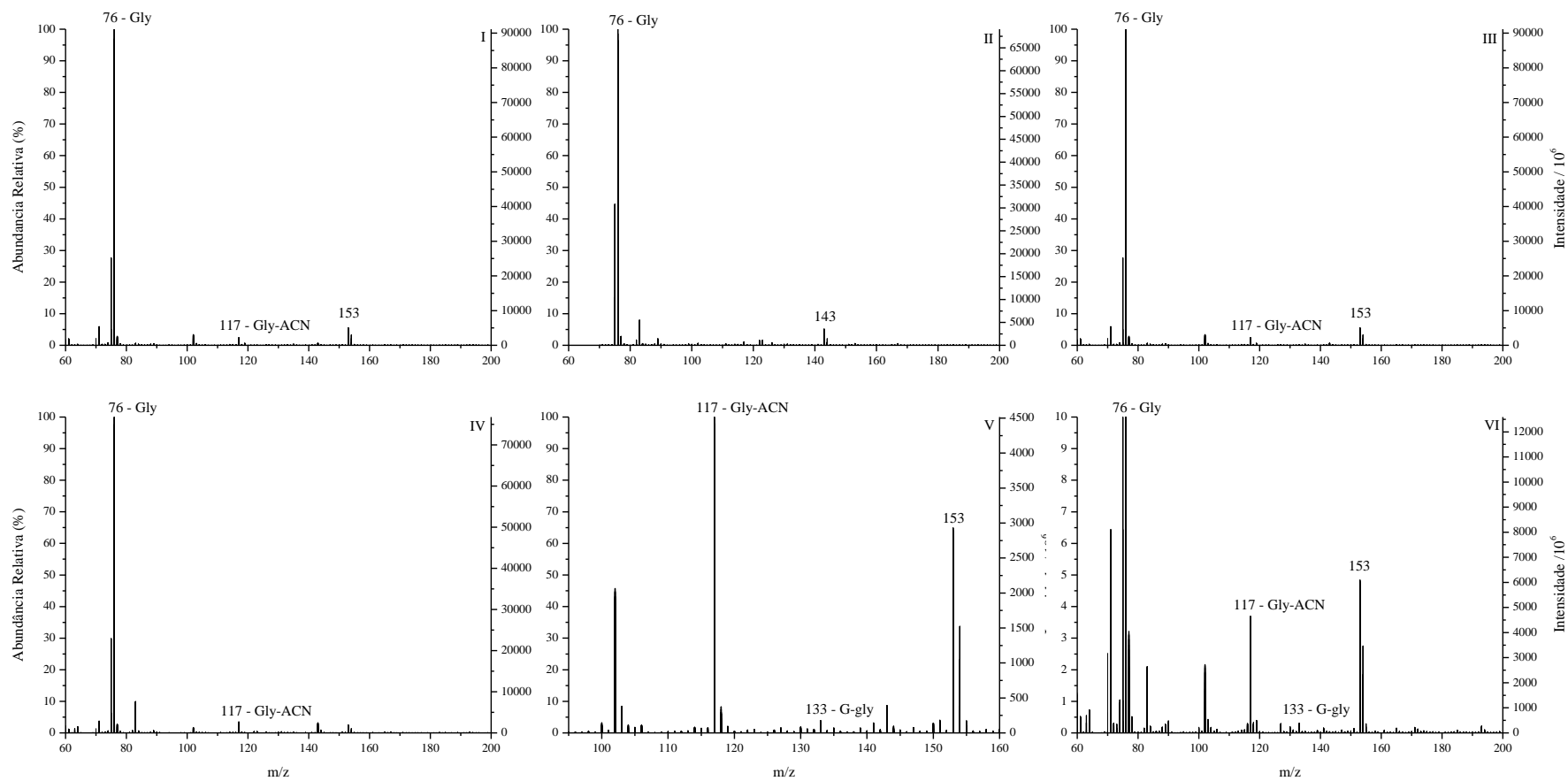


Figura 23. Espectros de massas dos extratos dos experimentos com glicina: **I)** tratamento A-G-I; **II)** tratamento B-G-I; **III)** tratamento C-G-I; **IV)** tratamento A-G-II; **V)** tratamento B-G-II; **VI)** tratamento C-G-II.

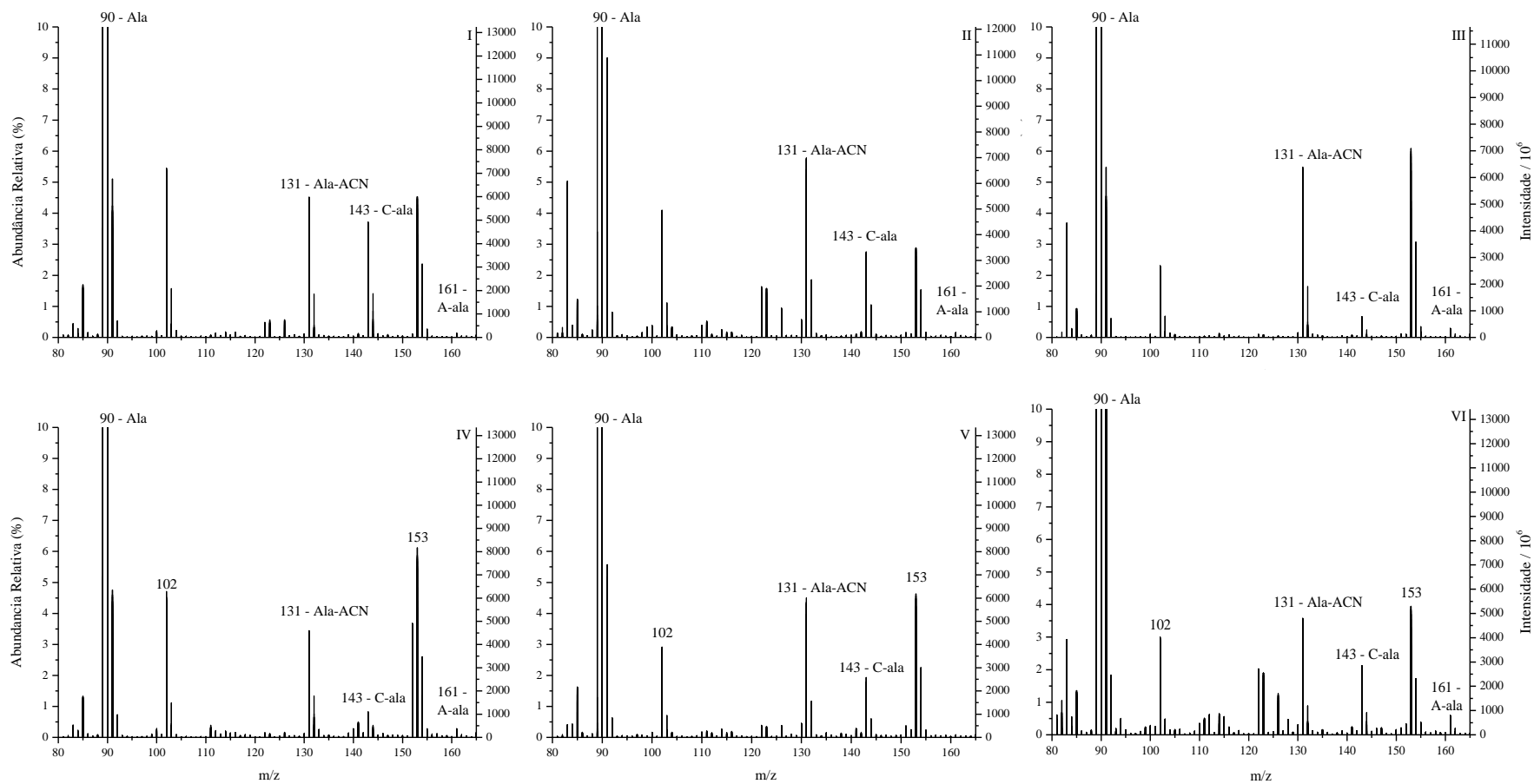


Figura 24. Espectros de massas dos extratos dos experimentos com alanina: **I)** tratamento A-G-I; **II)** tratamento B-G-I; **III)** tratamento C-G-I; **IV)** tratamento A-G-II; **V)** tratamento B-G-II; **VI)** tratamento C-G-II.

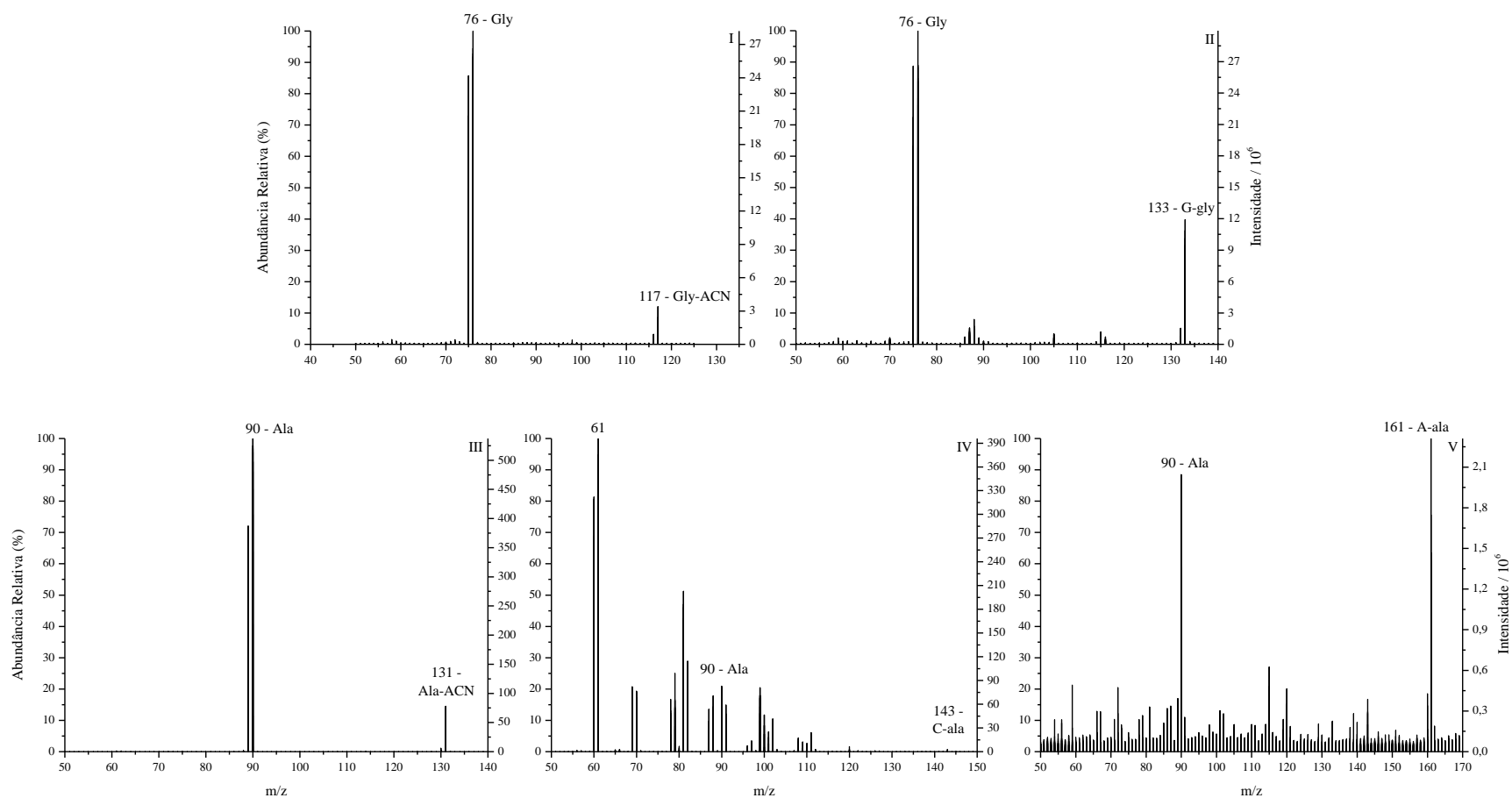


Figura 25. Espectros de massas das fragmentações dos picos de peptídeos com razão m/z para experimentos com glicina: **I)** 117; **II)** 133. Para experimentos com alanina: **III)** 131; **IV)** 143; **V)** 161.

5.5.5. Ensaio cinéticos

Figura 26 apresenta o comportamento da evolução da formação do peptídeo anidro (C-ala) e do dipeptídeo (A-ala) até quinze dias de reação química (tratamento C). A quantidade de C-ala formada possui um rendimento crescente até o fim de 11 dias e estabilizada com 15 dias. De modo oposto, o rendimento para A-ala foi baixo, durante o tempo observado, e não se verificou crescimento no rendimento com o tempo.

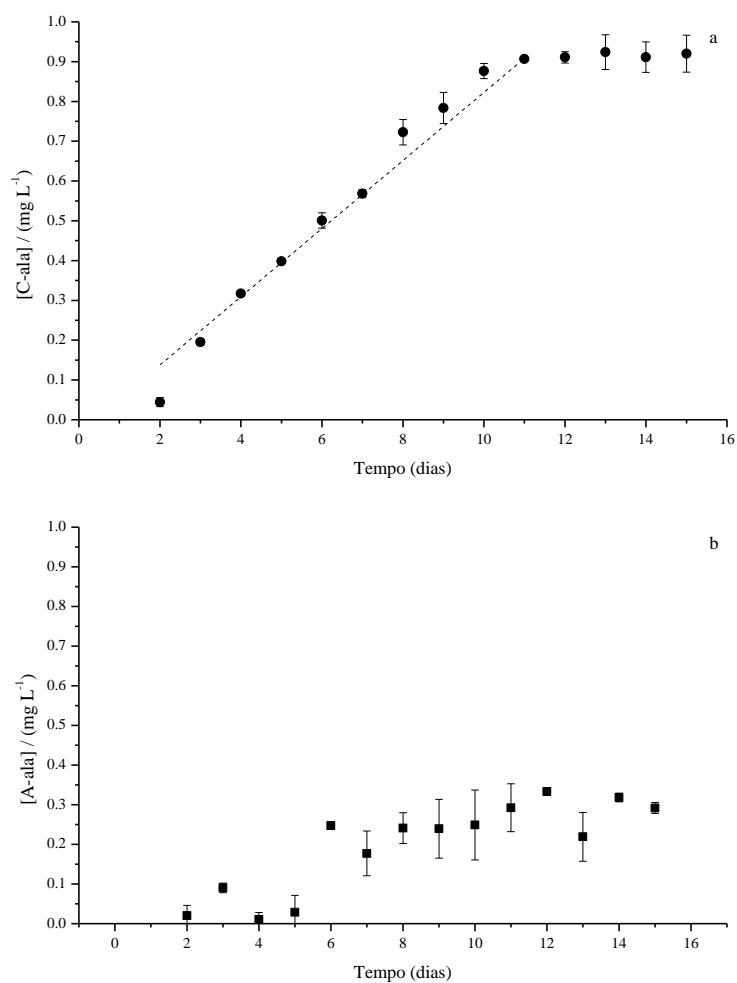


Figura 26. Quantidade de peptídeos formados a partir de alanina em goethita G-II a 95 °C: **a)** alanina anidra (C-Ala); **b)** dialanina (A-ala); **c)** modelo cinético de ordem zero aplicado aos dados de C-ala.

Para a síntese de C-ala, do dia 2 ao dia 11, aos dados podem ser aplicados a equação cinética para ordem zero com R^2 de 0,997. O modelo cinético de ordem zero implica em uma reação que é independente da concentração dos reagentes. Esse comportamento indica que a concentração dos reagentes não altera a velocidade da reação química. Para a síntese de A-ala, nenhum modelo pode ser aplicado, devido à baixa quantidade formada. O que significa que a

formação de C-ala não depende da quantidade de mineral ou alanina. Se não há variação da quantidade de mineral, pode-se assumir que o mineral age como uma superfície catalisadora.

O modelo de ordem de reação igual a zero resultou em uma constante de velocidade de $2,867 \times 10^{-11} \text{ mg L}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Bujdak e Rode (2004) obtiveram valores para constante de velocidade de $1,19 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ e $7,13 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ na presença e ausência de argila. Deve ser pontuado que o aumento da constante de velocidade para formação de peptídeos pode resultar em um aumento na constante de velocidade de hidrólise de peptídeos (Lambert, 2008).

5.6. Discussão

5.6.1. Implicações para a Evolução Química

Investigações anteriores demonstraram que a adsorção dos aminoácidos glicina, alanina, lisina, treonina e ácido glutâmico em hematita (Fe_2O_3), e de glicina, alanina, serina, histidina e fenilalanina em akaganeita ($\beta\text{-FeOOH}$) é dependente do valor de pH (Holm *et al.*, 1983 e Bentaleb *et al.*, 1994). No entanto, glicina possui baixa interação com Hematita. Mais recentemente, a adsorção de cisteína, um aminoácido com três grupos funcionais (tiol, amina e carboxílico), foi testado com três diferentes óxidos e oxi-hidróxidos de ferro, Hematita, magnetita e ferrihidrita. Esses testes de adsorção resultaram em reações químicas de conversão de cisteína em cistina. Os autores reportaram que a adsorção em Hematita poderia ser dependente do valor de pH (Vieira *et al.*, 2011). Do mesmo modo, outro artigo reportou que a adsorção de L-alanina em hematita possui seu máximo no ponto isoelétrico, o que significa que interações eletrostáticas estão envolvidas no processo de adsorção (Pandey *et al.*, 2013). Para aminoácidos mais complexos, como sarcosina, MIDA e EDDA, a adsorção em goethita é dependente de pH, grupo funcional e estrutura (Norén *et al.*, 2008). O efeito iônico na adsorção de glicina, α -alanina e β -alanina e goethita resulta na diminuição da quantidade de glicina e α -alanina adsorvida. Por outro lado, goethita adsorve maior quantidade de β -alanina, um aminoácido não proteico (Farias *et al.*, 2016). Paralelo a estes dados, a adição de aminoácidos em soluções de ferro iônico pode alterar o caminho da reação química de síntese de minerais (Carneiro *et al.*, 2013). Esses resultados sugerem que dependendo do aminoácido adicionado na síntese, podem ser formadas fases de diferentes óxidos e hidróxidos de ferro.

Foi demonstrado que o oxi-hidróxido ferrihidrita é capaz de promover a ligação peptídica (Matrajt e Blanot, 2004). Por meio de um processo inicial de adsorção, ensaios experimentais em condições secas e molhadas resultaram na formação dos peptídeos G-gly e A-Ala. As

formas cíclicas (*Diketopiperazines*) C-gly e C-ala foram também observadas. Peptídeos maiores como tripeptídeos, não foram detectadas. Um resultado significativo é que o rendimento da reação química aumentou com maior tempo reacional de um (1) dia para uma semana. O rendimento da polimerização de L-fenilalanina em hidróxidos de ferro (III) aumentaram com interações de adsorção (Naka *et al.*, 2007). A oligomerização de aminoácidos também foi testada com goethita, akaganeíta e hematita no estado seco (Shanker *et al.*, 2012). Os resultados mostraram que hematita catalisou principalmente peptídeos cíclicos a partir de glicina e L-alanina. Por outro lado, goethita favorece a síntese de dipeptídeos. Neste capítulo apresentam-se procedimentos similares aos de Shanker *et al.* (2012) com relação aos tratamentos A e B (estado seco). Entretanto, os dados aqui apresentados não revelam a formação de dipeptídeos a partir de glicina, apenas para L-alanina. De fato, a formação apenas ocorre para glicina na presença de goethita G-II para os tratamentos B e C. Sendo assim, resultados mais otimistas ocorrem para L-ala (Tabela 3). Os melhores rendimentos ocorrem para L-ala gerando C-ala para ambas goethitas G-I e G-II. Georgelin *et al.*, (2017) reportaram a formação de peptídeos de glicina em superfície de magnetita, hematita e akaganeíta na temperatura de 180-190 °C. A reação de oligomerização de glicina e L-ala em quatro tipos de ferritas também foram detectadas nas temperaturas de 50 até 120 °C, por 35 dias e sem o uso de ciclos secos/molhados (Iqubal *et al.*, 2017). Deve ser pontuado que ferrita não é um óxido de ferro. Portanto, uma questão surge: *Tiveram os óxidos de ferro uma relevância prebiótica?*

Dever ser destacado que experimentos de Química Prebiótica com óxidos e hidróxidos de ferro são escassos. Apenas algumas investigações foram desenvolvidas até atualmente. Ferro é um elemento abundante e difundido na crosta terrestre, e é vital para funcionamento adequado dos seres vivos. Neste sentido, mesmo que a síntese de peptídeos não seja eficiente, como os dados sugerem, é um importante resultado para a Química Prebiótica. Sendo assim, sabe-se que: **i)** Aminoácidos interagem com a superfície de óxidos de ferro, com relação a processos de adsorção. Não obstante, essa interação é dependente do valor de pH. Assim, nem todos os cenários são favoráveis a processos prebióticos; **ii)** Peptídeos cíclicos e dipeptídeos são formados vi assistência de óxidos de ferro. No entanto, grandes peptídeos não são sintetizados, pelo menos em quantidades consideráveis. Não sendo uma perspectiva favorável para a Evolução Química.

A formação da ligação peptídica requer a retirada de uma molécula de água a partir de duas moléculas de aminoácidos. Em solução aquosa a reação é termodinamicamente

desfavorável, pois, requer a eliminação de uma molécula de água em solução. Por outro lado, há a barreira cinética, onde a presença do mineral pode resultar na diminuição do obstáculo energético. De fato, superfície mineral age de modo a diminuir a energia de ativação pelo processo de adsorção. Portanto, poderia se assumir que de modo a oligomerização se iniciar, interações de superfície, como processos de adsorção, são requeridas. Este capítulo apresenta ensaios onde após 10 dias de aquecimentos a quantidade de peptídeos não aumentou, Matrajt e Blanot (2004) observaram comportamento similar. Deve ser pontuado que Shaker *et al.* (2012) não observaram esta queda no rendimento reacional.

5.6.2. Revisitando a Hipótese de Bernal – Minerais como Fábricas Prebióticas

De acordo com a Hipótese de Bernal, o papel dos minerais seria de solucionar dois principais problemas prebióticos, a diluição infinita e suportar evolução química por meio de polimerização, o que significa promover reações químicas. Na superfície mineral, como argilas, óxidos de ferro e zeólitas, reações de oligomerização podem acontecer (Lambert, 2008). Deste modo, levanta-se a seguinte questão: *Poderiam os minerais agir como fábricas prebióticas para Evolução Química?* A partir da produção de oligômeros, as investigações levam a dois dilemas: **i)** o chamado *dead end* (fim das reações); **ii)** e disponibilidade prebiótica. O primeiro ocorre pela formação de peptídeo cíclicos, em que não se torna mais possível o aumento do peptídeo. Uma vez que formada a ligação peptídica (ligação amina) requer a remoção de uma molécula de água, é precedida de um ataque nucleofílico no átomo de nitrogênio (N) do grupo amino no átomo de carbono no grupo carboxílico (COOH) (El-Faham e Albericio, 2011). Assim, nos peptídeos cíclicos o grupo amina não está disponível para promoção do ataque nucleofílico, ou seja, o alongamento termina.

Para peptídeo lineares, quanto maior a cadeia, maiores as interações com a superfície mineral por forças de van der Waals. Se um oligômero longo é preso (*trapped*) por processo de adsorção, sua disponibilidade prebiótica é comprometida, uma vez condições químicas mais extremas são necessárias para desorver esses peptídeos. Nos capítulos anteriores, ensaios sugerem que adenina, fortemente ligada à montmorillonita, necessita de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de hidróxido de potássio (KOH) para promover a desorção. Holm *et al* (1983) sugeriram que polímeros resultados de replicação prebiótica poderiam ser removidos da matriz mineral por soluções redutoras. No entanto, um comportamento interessante para goethita foi a extração dos peptídeos por simples água ultra pura. Nenhuma solução foi necessária para se obter a fase orgânica. Se por um lado, os resultados mostram um cenário de baixa cinética e rendimento

para formação dos peptídeos sob superfície de Goethita, por outro lado há disponibilidade para os produtos formados.

Concluindo, *Poderiam os minerais agir como fábricas prebióticas para Evolução Química?* Os resultados suportam a hipótese de Bernal em evolução química. Entretanto, a obtenção peptídeos prebióticos com maiores cadeias, e até com algumas propriedades bioquímicas, como enzimáticas, permanecem com um próximo passo para estudos de Química Prebiótica.

5.7. Conclusão

A formação de peptídeos em goethita sob aquecimento foi observada. Para a glicina observou-se formação de dipeptídeo G-gly, e para Ala ciclo (C-ala) e dipeptídeo (A-ala). Dessa forma foi possível demonstrar a formação de oligômeros simples simulando condições da Terra Primitiva. Mesmo que a constante de velocidade foi baixa, a barreira cinética foi superada mediante assistência do mineral.

6. Considerações Finais

Realizaram-se diversos ensaios químicos simulando algumas condições da Terra Primitiva. A base nitrogenada Uracila é capaz de interagir com os cátions provenientes das diferentes águas do mar, mediante do grupo carbonila ($C_4=O$). Pode-se constatar mudanças na reatividade, com relação ao nitrogênio N_1 , devido à diminuição de energia dos orbitais HOMO e diminuição da carga neste átomo (N_1 com carga mais negativa). Estes resultados demonstram que quando coordenada com alguns cátions metálicos, uracila altera sua reatividade. Isto resulta, no caso da química prebiótica, na formação de nucleosídeos ou nucleotídeos, moléculas componentes do DNA/RNA.

Observou-se também que a radiação ionizante (gama- Co^{60}) degrada facilmente a base nitrogenada adenina em solução aquosa. Entretanto, um resultado inédito é que a taxa de degradação é menor quando em solução salina, simulando água do mar com concentrações de íons de 4,0 bilhões de anos atrás. Isto é um forte indicativo de que é necessário utilizar-se de soluções análogas às das variadas águas do mar, conforme proposto por Zaia (2012). Uma vez que íons em solução aquosa podem alterar a quantidade de adenina que é degradada.

Paralelo a estes dados, quando adenina é adsorvida em suspensão de montmorillonita sua decomposição via irradiação não é observada. Resultados estes que fortalecem a hipótese de Bernal (1949 e 1951). Entretanto, quando em suspensão de montmorillonita em água do mar, este sistema se apresentou mais estável que em suspensão de argila em água destilada. Indicando mais uma vez a importância de se usar íons em ensaios prebióticos. A irradiação dos sólidos obtidos a partir de soluções de adenina em água destilada e do mar mostraram que os íons sulfatos interagem com a radiação ionizante. Dessa forma, por uma espécie de competição, os íons provenientes da água do mar auxiliam na diminuição da decomposição da adenina, em outras palavras, pode-se assumir um efeito de proteção das moléculas orgânicas.

Reações de oligomerização foram testadas, afim de se obter peptídeos com maior massa molecular. Entretanto, em superfície de goethita obteve-se baixo rendimento reacional para os peptídeos a partir dos aminoácidos glicina e alanina. A parte orgânica foi facilmente extraída da matriz mineral, tornando-a disponível para outras reações químicas. Mas, a formação majoritária de peptídeos cíclicos indica um *dead end*. Ou seja, pode-se supor que talvez o mineral goethita não tenha majoritária contribuição para reações de polimerização na Terra Primitiva. Deve-se salientar que mesmo este último não sendo um resultado favorável para Evolução Química, é importante pois o elemento Ferro (Fe) era abundante na Terra Primitiva,

e óxidos de ferro estavam presentes, portanto, estes minerais devem ser investigados no contexto da química prebiótica.

Concluindo, caracterizaram-se vários tipos de interações físico químicas entre duas espécies de bases nitrogenadas e dois aminoácidos com íons presentes em soluções de água do mar e com dois tipos de minerais, todos ensaios simulando condições da Terra primitiva. Estes experimentos foram realizados de modo a aprofundar as hipóteses de Oparin e Haldane, em evolução química, e de Bernal, sobre a assistência e proteção mineral. Assim como Charles Darwin esboçou, o surgimento da vida deve ter seguido as leis da química, ou reações químicas. Esta presente tese corrobora com ideia de que moléculas orgânicas essenciais aos seres vivos interagem com espécies químicas, íons da água do mar, e com estruturas maiores, argilas e óxidos de ferro. Os comportamentos observados são regidos por interações físico químicas, contribuindo assim para a evolução química e proteção destas biomoléculas.

7. Referências Bibliográficas

Albrecht, G., & Corey, R. B. (1939). The crystal structure of glycine. *Journal of the American Chemical Society*, 61(5), 1087-1103.

Allen, A. O. (1961). *The radiation chemistry of water and aqueous solutions*. New York: Van Nostrand.

Anbalagan G., Mukundakumari S., Murugesan K.S., Gunasekaran S. (2009) Infrared, optical absorption, and EPR spectroscopic studies on natural gypsum. *Vibrational Spectroscopy* 50: 226 – 230.

Anizelli, P. R., Baú, J. P., Nabeshima, H. S., da Costa, M. F., de Santana, H., & Zaia, D. A. (2014). An experimental and theoretical vibrational study of interaction of adenine and thymine with artificial seawaters: a prebiotic chemistry experiment. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 126, 184-196.

Ault, B. S. (1978). Infrared spectra of argon matrix-isolated alkali halide salt/water complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 100(8), 2426-2433.

Balachandran, V., & Parimala, K. (2013). Molecular structures, FT-IR and FT-Raman spectra, NBO analysis, NLO properties, reactive sites and quantum chemical calculations of keto–enol tautomerism (2-amino-4-pyrimidinol and 2-amino-pyrimidine-4 (1H)-one). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 30-51.

Barnes, A. J., Stuckey, M. A., & Le Gall, L. (1984). Nucleic acid bases studied by matrix isolation vibrational spectroscopy: Uracil and deuterated uracils. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 40(5), 419-431.

Basile B., Lazcano A., Oro, J (1984) Prebiotic syntheses of purines and pyrimidines. *Advances in Space Research* 4: 125 – 131.

Baú J.P.T., Carneiro C.E.A., de Souza Junior I.G., Souza C.M.D., da Costa A.C.S., di Mauro E., Zaia C.T.B.V., Coronas J., Casado C., de Santana H., Zaia D.A.M. (2012). Adsorption of Adenine and Thymine on Zeolites: FT-IR and EPR Spectroscopy and X-Ray Diffraction and SEM Studies. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 42: 19 – 29.

- Becke, A. D. (1988). Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical review A*, 38(6), 3098.
- Becke, A. D. (1993). Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys*, 98, 5648-5652.
- Benetoli L.O.D.B., de Santana H., Zaia C.T.B., Zaia D.A.M. (2008) Adsorption of nucleic acid bases on clays: an investigation using Langmuir and Freundlich isotherms and FT-IR spectroscopy. *Monatshefte für Chemie* 139: 753 – 761.
- Ben-Taleb, A., Vera, P., Delgado, A. V., & Gallardo, V. (1994). Electrokinetic studies of monodisperse hematite particles: effects of inorganic electrolytes and amino acids. *Materials chemistry and physics*, 37(1), 68-75.
- Bernal J.D. (1951). *The Physical Basis of Life*. Routledge and Kegan Paul, London.
- Bernal, J. D. (1949). The physical basis of life. *Proceedings of the Physical Society. Section A*, 62(9), 537.
- Boldyreva, E. V., Drebuschak, V. A., Drebuschak, T. N., Paukov, I. E., Kovalevskaya, Y. A., & Shutova, E. S. (2003). Polymorphism of glycine, Part I. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 73(2), 409-418.
- Brown, E., Colling, A., Park, D., Phillips, J., Rothery, D. & Wright, J. (2004). *Seawater: Its Composition, Properties and Behavior*. The Open University, Oxford.
- Brown, G. B., Clarke, D. A., Biesele, J. J., Kaplan, L., & Stevens, M. A. (1958). Purine N-oxides III. Some biological activities of adenine 1-N-oxide derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 233(6), 1509-1512.
- Brown, G. B., Sugiura, K., & Cresswell, R. M. (1965). Purine N-oxides. XVI. Oncogenic Derivatives of Xanthine and Guanine. *Cancer research*, 25(7 Part 1), 986-991.
- Bujdák, J., & Rode, B. M. (1996). The effect of smectite composition on the catalysis of peptide bond formation. *Journal of molecular evolution*, 43(4), 326-333.
- Bujdák, J., & Rode, B. M. (2004). On the mechanisms of oligopeptide reactions in solution and clay dispersion. *Journal of Peptide Science*, 10(12), 731-737.

Bukka K., Miller J.D., Shabtai J. (1992). FTIR study of deuterated montmorillonites: Structural features relevant to pillared clay stability. *Clays and Clay Minerals* 40: 92–102.

Byberg, J. R. (1986). O^- detected by ESR as a primary electron-excess defect in X-irradiated K_2SO_4 . *The Journal of chemical physics*, 84(11), 6083-6085.

Canhisares-Filho, J. E., Carneiro, C. E., De Santana, H., Urbano, A., da Costa, A. C., Zaia, C. T., & Zaia, D. A. (2015). Characterization of the adsorption of nucleic acid bases onto ferrihydrite via Fourier transform infrared and surface-enhanced Raman spectroscopy and X-ray diffractometry. *Astrobiology*, 15(9), 728-738.

Carneiro C.E.A., Berndt G., de Souza Junior I.G., de Souza C.M., Paesano Jr. A., da Costa A.S.C., di Mauro E., de Santana H., Zaia C.T.B.V., Zaia D.A.M. (2011) Adsorption of adenine, cytosine, thymine, and uracil on sulfide-modified montmorillonite: FT-IR, Mössbauer and EPR spectroscopy and X-ray diffractometry studies. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 41: 453 – 468.

Carneiro C.E.A., Machado C.F.C., de Souza Jr. I.G., Paesano Junior A., di Mauro E., da Costa A.C.S., de Souza C.M.D., de Santana H., Zaia D.A.M. (2013) Modification of montmorillonite with sodium sulfide for prebiotic chemistry studies: Characterization using spectroscopy methods and X-ray diffractometry. *Applied Clay Science* 86: 18 – 22.

Carneiro, C. E., Ivashita, F. F., de Souza, I. G., de Souza, C. M., Paesano, A., da Costa, A. C., di Mauro, E., de Santana, H., Zaia, C. T. B. V., Zaia, D. A. (2013). Synthesis of goethite in solutions of artificial seawater and amino acids: a prebiotic chemistry study. *International Journal of Astrobiology*, 12(2), 149-160.

Castañeda, J. C., Mendoza, A. N. (2016). Radiolysis and Thermolysis of Cytosine: Importance in Chemical Evolution. *Journal of Nuclear Physics, Material Sciences, Radiation and Applications*, 4(1), 183-190.

Christensen J.J., Rytting J.H., Izatt R.M. (1970). Thermodynamic pK , ΔH° , ΔS° , and ΔCp° values for proton dissociation from several purines and their nucleosides in aqueous solution. *Biochemistry* 9: 4907 – 4913.

Christensen, J. J., Rytting, J. H., & Izatt, R. M. (1967). Thermodynamics of proton dissociation in dilute aqueous solution. VII. pK , ΔH degree., and ΔS degree. values for

proton ionization from several pyrimidines and their nucleosides at 25. degree. *The Journal of Physical Chemistry*, 71(8), 2700-2705.

Colthup, N.B, Lawrence H. Daly, Stephen E. Wiberley. (1990). *Introduction to infrared and Raman Spectroscopy*. 3 ed. NB Colthup and LH Daly, Academic Press, Inc., San Diego.

Conlay J.J. (1963) Effect of ionizing radiation on adenine in aerated and de-aerated aqueous solutions. *Nature* 197: 555 – 557.

Cornell, R. M., & Schwertmann, U. (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. John Wiley & Sons.

Cysewski, P., Jeziorek, D., Olinski, R., & Woznicki, W. L. (1995). Ab Initio Studies on the Structure and Properties of the Hydroxyl-Radical-Modified Adenine Derivatives in Different Tautomeric Forms. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(24), 9702-9708.

De Faria, D. L. A., Lopes, F. N. (2007). Heated goethite and natural hematite: can Raman spectroscopy be used to differentiate them?. *Vibrational Spectroscopy*, 45(2), 117-121.

De Ronde, C. E., deR Channer, D. M., Faure, K., Bray, C. J., & Spooner, E. T. (1997). Fluid chemistry of Archean seafloor hydrothermal vents: Implications for the composition of circa 3.2 Ga seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(19), 4025-4042.

Dobbs, K. D., & Hehre, W. J. (1987). Molecular orbital theory of the properties of inorganic and organometallic compounds 5. Extended basis sets for first-row transition metals. *Journal of Computational Chemistry*, 8(6), 861-879.

Draganić, I. G. (2005). Radiolysis of water: a look at its origin and occurrence in the nature. *Radiation Physics and Chemistry*, 72(2), 181-186.

Draganić, I. G., Draganić, Z. D. (1971). *The radiation chemistry of water* (Vol. 26). New York and London: Academic Press.

Dunning Jr, T. H. (1989). Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *The Journal of chemical physics*, 90(2), 1007-1023.

Dunning, T.H., Peterson, K.A., Wonn, D.E. (1998). *Encyclopedia of computational chemistry*, Wiley, New York.

El-Faham, A., Albericio, F. (2011). Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chemical reviews*, 111(11), 6557-6602.

Farias, A. P. S., Carneiro, C. E., de Batista Fonseca, I. C., Zaia, C. T., & Zaia, D. A. (2016). The adsorption of amino acids and cations onto goethite: a prebiotic chemistry experiment. *Amino acids*, 48(6), 1401-1412.

Ferraro, J. R.; Walker, A. Comparison of the Infrared Spectra (4000-70 cm^{-1}) of Several Hydrated and Anhydrous Salts of Transition Metals. *The Journal of Chemical Physics*. v.42, n.4, p.1278-1285, 1965.

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

Ferris, J. P. (2002). Montmorillonite catalysis of 30–50 mer oligonucleotides: laboratory demonstration of potential steps in the origin of the RNA world. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 32(4), 311-332.

Ferris, J. P. (2005). Mineral catalysis and prebiotic synthesis: montmorillonite-catalyzed formation of RNA. *Elements*, 1(3), 145-149.

Ferris, J. P., & Hagan Jr, W. J. (1984). HCN and chemical evolution: the possible role of cyano compounds in prebiotic synthesis. *Tetrahedron*, 40(7), 1093-1120.

Ferris, J. P., Ertem, G., Agarwal, V. (1989b). Mineral catalysis of the formation of dimers of 5'-AMP in aqueous solution: the possible role of montmorillonite clays in the prebiotic synthesis of RNA. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 19(2), 165-178.

Ferris, J. P., Ertem, G., Agarwal, V. K. (1989a). The adsorption of nucleotides and polynucleotides on montmorillonite clay. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 19(2), 153-164.

Feuillie C., Daniel I., Michot L.J., Pedreira-Segade U. (2013). Adsorption of nucleotides onto Fe-Mg-Al rich swelling Calys. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 120: 97-108.

Feuillie C., Sverjensky D. A., Hazen R. M. (2015). Attachment of ribonucleotides on α -alumina as a function of pH, ionic strength and surface loading. *Langmuir* 31: 240-248.

Fourdrin C., Aarrachi H., Latrille C., Esnouf S., Bergaya F., Le Caër S. (2013). Water radiolysis in exchanged-montmorillonites: the H₂ production mechanisms. *Environmental Science & Technology* 47: 9530 – 9537.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery, Jr., J. A., Vreven, T., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J. E., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y., Morokuma, K., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dapprich, S., Daniels, A. D., Strain, M. C., Farkas, O., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Gonzalez, C., and Pople, J. A., Gaussian 03, Revision C.02, Wallingford CT, 2004.

Georgelin, T., Akouche, M., Jaber, M., Sakhno, Y., Matheron, L., Fournier, F., Méthivier, C., Martra, G., Lambert, J. F. (2017). Iron (III) Oxide Nanoparticles as Catalysts for the Formation of Linear Glycine Peptides. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017(1), 198-211.

Giese, B., & McNaughton, D. (2002). Surface-enhanced Raman spectroscopic study of uracil. The influence of the surface substrate, surface potential, and pH. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(6), 1461-1470.

Goodgame, M., & Jakubovic, D. A. (1987). Metal complexes of uracils. *Coordination chemistry reviews*, 79(1-2), 97-134.

Gould, I. R., Vincent, M. A., & Hillier, I. H. (1992). A theoretical study of the infrared spectrum of uracil. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1), 69-71.

Gournis D., Mantaka-Marketou A.E., Karakassides M.A., Petridis D. (2000) Effect of γ -irradiation on clays and organoclays: a Mössbauer and XRD study. *Physics and Chemistry of Minerals* 27: 514 – 521.

Gournis D., Mantaka-Marketou A.E., Karakassides M.A., Petridis, D. (2001). Ionizing radiation-induced defects in smectite clays. *Physics and Chemistry of Minerals* 28: 285 – 290.

Gromov, V. V., & Morton, J. R. (1966). Paramagnetic centers in irradiated potassium sulfate. *Canadian Journal of Chemistry*, 44(4), 527-528.

Guskos, N., Papadopoulos, G. J., Likodimos, V., Patapis, S., Yarmis, D., Przepiera, A., Przepiera, K., Majszczyk, J., Typek, J., Wabia, M., Aidinis, K., Drazek, Z. (2002). Photoacoustic, EPR and electrical conductivity investigations of three synthetic mineral pigments: hematite, goethite and magnetite. *Materials Research Bulletin*, 37(6), 1051-1061.

Guzmán-Marmolejo A (2003). Influencia de una arcilla en la radiolisis de adenina simulando microambientes primitivos. Asesor del tema: Dra. Alicia Negrón Mendoza. Tesis que para obter el título de Químico. Laboratorio de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares-UNAM

Guzmán-Marmolejo A., Ramos-Bernal S., Negrón-Mendoza A. (2000). Irradiation of Adenine Adsorbed in Na-Montmorillonite: implications to chemical evolution studies. In: *Astrobiology*, J. Chela-Flores et al. (eds),. Kluwer Academic Publishers, Springer Netherlands: 271 – 274.

Guzman-Marmolejo A., Ramos-Bernal S., Negrón-Mendoza A., Mosqueira G. (2009). Survival of Purines and Pyrimidines Adsorbed on a Solid Surface in a High Radiation Field. In: *Bioastronomy 2007: Molecules, Microbes and Extraterrestrial Life*, ASP Conferences, 420: 229 – 232.

Hartmann, J., Quint, R. M., & Getoff, N. (2007). Radiolysis of aqueous adenine (vitamin B4) and 8-hydroxyadenine. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(5), 834-840.

Hashizume, H., & Theng, B. K. G. (1999). Adsorption of DL-alanine by allophane: effect of pH and unit particle aggregation. *Clay Minerals*, 34(2), 233-238.

Hashizume, H. (2015). Adsorption of nucleic acid bases, ribose, and phosphate by some clay minerals. *Life*, 5(1), 637-650.

Hata, K., Inoue, H., Kojima, T., Iwase, A., Kasahara, S., Hanawa, S., Ueno, F., Tsukada, T. (2016) Hydrogen Peroxide Production by Gamma Radiolysis of Sodium Chloride Solutions Containing a Small Amount of Bromide Ion. *Nuclear Technology* 193(3): 434 – 443.

- Hata, K., Satoh, T., Motooka, T., Ueno, F., Hanawa, S., Kasahara, S., & Tsukada, T. (2015). Simulation for radiolytic products of seawater: effects of seawater constituents, dilution rate, and dose rate. *Journal of Nuclear Science and Technology*, 53(8), 1183-1191.
- Hayatsu R., Studier M.H., Moore L.P., Anders, E. (1975) Purines and triazines in the Murchison meteorite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 39: 471 – 488.
- Hazen R.M., Papineau D., Bleeker W., Downs R.T., Ferry J.M., McCoy T.J., Sverjensky D.A., Yang H. (2008) Mineral evolution. *American Mineralogist* 93: 1693–1720.
- Holm, N. G., Dowler, M. J., Wadsten, T., Arrhenius, G. (1983). β -FeOOH Cl_n (akaganéite) and Fe_{1-x}O (wüstite) in hot brine from the Atlantis II Deep (Red Sea) and the uptake of amino acids by synthetic β -FeOOH· Cl_n . *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 47(8), 1465-1470.
- Holm, N. G., Dumont, M., Ivarsson, M., & Konn, C. (2006). Alkaline fluid circulation in ultramafic rocks and formation of nucleotide constituents: a hypothesis. *Geochemical transactions*, 7(1), 7.
- Holm, N. G., Ertem, G., & Ferris, J. P. (1993). The binding and reactions of nucleotides and polynucleotides on iron oxide hydroxide polymorphs. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 23(3), 195-215.
- Iishi K. (1979) Phononspectroscopy and lattice dynamical calculations of anhydrite and gypsum. *Physics and Chemistry of Minerals* 4: 341 – 359.
- Iqbal, M. A., Sharma, R., & Jheeta, S. (2017). Thermal Condensation of Glycine and Alanine on Metal Ferrite Surface: Primitive Peptide Bond Formation Scenario. *Life*, 7(2), 15.
- Izawa M.R.M, Nesbit H.W., MacRae N.D., Hoffman E.L. (2010) Composition and evolution of the early oceans: evidence from Tagish lake meteorite. *Earth and Planetary Science Letters* 298: 443-449.
- Kamaluddin. (2013). Role of metal oxides in chemical evolution. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1543, No. 1, pp. 90-98). AIP.
- Kamiya, H. (2003). Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary. *Nucleic Acids Research*, 31(2), 517-531.

Kern, D. L., Hokanson, G. C., French, J. C., & DALLEY, N. K. (1985). Guanine-7-oxide, a novel antitumor antibiotic. *The Journal of antibiotics*, 38(5), 572-574.

Kitahara, M., Ishii, K., Kawaharada, H., Watanabe, K., Suga, T., Hirata, T., & Nakamura, S. (1985). 7-Hydroxyguanine, a novel antimetabolite from a strain of *Streptomyces purpurascens*. II. Physico-chemical properties and structure determination. *The Journal of antibiotics*, 38(8), 977-980.

Kobayashi, K., Hua, L. L., Gehrke, C. W., Gerhardt, K. O., & Ponnampereuma, C. (1986). Abiotic synthesis of nucleic acid bases by electric discharge in a simulated primitive atmosphere. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 16(3), 299-300.

Kumagai Y., Kimura A., Taguchi M., Nagaishi R., Yamagishi I., Kimura T. (2013) Hydrogen production in gamma radiolysis of the mixture of mordenite and seawater: Fukushima NPP Accident Related. *Journal of Nuclear Science and Technology* 50: 130 – 138.

Kumar, A. and Kamaluddin (2012). Oligomerization of glycine and alanine on metal (II) octacyanomolybdate (IV): role of double metal cyanides in prebiotic chemistry. *Amino acids*, 43(6), 2417-2429.

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

Lailach G.E., Brindley G.W. (1969). Specific co-absorption of purines and pyrimidines by montmorillonite (clay organic studies XV). *Clays and Clay Minerals* 17: 95 – 100.

Lailach G.E., Thompson T.D., Brindley G.W. (1968a) Absorption of pyrimidines, purines, and nucleosides by Li-, Na-, Mg-, and Ca-montmorillonite (clay-organic studies XII). *Clays and Clay Minerals* 16: 285 – 293.

Lailach G.E., Thompson T.D., Brindley G.W. (1968b) Absorption of pyrimidines, purines, and nucleosides by Co-, Ni-, Cu-, and Fe(III)-montmorillonite (clay-organic studies XIII). *Clays and Clay Minerals* 16: 295 – 301.

Lambert J. (2008) Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: a review. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 38: 211 – 242.

Lambert J.F., Jaber M., Georgelin T., Stievano L. (2013). A comparative study of the catalysis of peptide bond formation by oxides surfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15: 13371-13380.

Lambert, J. F. (2008). Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: a review. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 38(3), 211-242.

LaRowe D.E., Regnier P. (2008). Thermodynamic potential for the abiotic synthesis of adenine, cytosine, guanine, thymine, uracil, ribose and deoxyribose in hydrothermal systems. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 38: 383-397.

Lee, C., Yang, W., & Parr, R. G. (1988). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical review B*, 37(2), 785.

Leś, A., Adamowicz, L., Nowak, M. J., & Lapinski, L. (1992). The infrared spectra of matrix isolated uracil and thymine: an assignment based on new theoretical calculations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 48(10), 1385-1395.

Li, J., Wang, Z., Yang, X., Hu, L., Liu, Y., & Wang, C. (2007). Evaluate the pyrolysis pathway of glycine and glycyglycine by TG-FTIR. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 80(1), 247-253.

Lord, C., & Thomas Jr, G. J. (1967). Raman spectral studies of nucleic acids and related molecules—I Ribonucleic acid derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 23(9), 2551-2591.

Madejová J. (2003) FTIR techniques in clay mineral studies. *Vibrational spectroscopy* 31:1 – 10.

Martins Z., Botta O., Fogel M.L., Sephton M.A., Glavin D.P., Watson J.S., Dworkin J.P., Schwartz A.W., Pascale E. (2008). Extraterrestrial nucleobases in the Murchison meteorite. *Earth and Planetary Science Letters* 270: 130-136.

Matrajt, G., & Blanot, D. (2004). Properties of synthetic ferrihydrite as an amino acid adsorbent and a promoter of peptide bond formation. *Amino acids*, 26(2), 153-158.

Meléndez-López A.L., Ramos-Bernal S., Ramírez-Vázquez M.L. (2014) Stability of guanine adsorbed in a clay mineral under gamma irradiation at temperatures (77 and 298 K):

Implications for chemical evolution studies. *Radiation Physics*, In: AIP Conference Proceedings 1607(1): 111 – 115. Doi: 10.1063/1.4890710

Miller, F. A., & Wilkins, C. H. (1952). Infrared spectra and characteristic frequencies of inorganic ions. *Analytical chemistry*, 24(8), 1253-1294.

Miller, S. L. (1953). A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*, 117(3046), 528-529.

Monnard, P. A., Apel, C. L., Kanavarioti, A., & Deamer, D. W. (2002). Influence of ionic inorganic solutes on self-assembly and polymerization processes related to early forms of life: Implications for a prebiotic aqueous medium. *Astrobiology*, 2(2), 139-152.

Mosqueira F.G., Albarran G., Negrón-Mendoza A. (1996). A review of conditions affecting the radiolysis due to 40 K on nucleic acid bases and their derivatives adsorbed on clay minerals: implications in prebiotic chemistry. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 26: 75 – 94.

Naka, K., Tampo, Y., & Chujo, Y. (2007). Effect of iron (III) hydroxide sol as a support for oligomerization of L-phenylalanine in aqueous solution. *Journal of organometallic chemistry*, 692(1-3), 436-441.

Nakamoto, K. (1977). *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*. third ed., Wiley, & Sons, New York.

Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B, Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, 2009.

Negron A., Ramos S., Blumenfeld A.L., Pacheco G., Fripiat J.J. (2002) On the structural stability of montmorillonite submitted to heavy γ -irradiation. *Clays and clay minerals* 50: 35 – 37.

Negrón-Mendoza, A., Ramos-Bernal, S., Colín-Garcá, M., & Heredia, A. (2016). Chemical evolution: an approach from radiation chemistry. *Radiation & Applications*, 1, 159-164.

Nelson, W. H., Sagstuen, E., Hole, E. O., Close, D. M. (1992). Ionization of Adenine Derivatives: EPR and ENDOR Studies of X-Irradiated Adenine • HCl • $\frac{1}{2}$ H₂O and Adenosine • HCl. *Radiation research*, 131(3), 272-284.

Nelson, W. H., Sagstuen, E., Hole, E. O., Close, D. M. (1998). Electron spin resonance and electron nuclear double resonance study of X-irradiated deoxyadenosine: Proton transfer behavior of primary ionic radicals. *Radiation research*, 149(1), 75-86.

Nguyen-Thanh D., Block K., Bandosz T.J. (2005) Adsorption of hydrogen sulfide on montmorillonites modified with iron. *Chemosphere* 5: 343 – 353.

Norén, K., Loring, J. S., Persson, P. (2008). Adsorption of alpha amino acids at the water/goethite interface. *Journal of colloid and interface science*, 319(2), 416-428.

Nurakhmetov, T. N., Kuterbekov, K. A., Daurenbekov, D. H., Salikhodzha, Z. M., Kainarbay, A. K., Zhunusbekov, A. M., Bekmyrza, K. (2016). Radiation defects in alkali metal sulfates. *Radiation Physics and Chemistry*, 119, 218-222.

Orgel, L. E. (1998). Polymerization on the rocks: theoretical introduction. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 28(3), 227-234.

Ortiz, S., Alvarez-Ros, M. C., Palafox, M. A., Rastogi, V. K., Balachandran, V., & Rathor, S. K. (2014). FT-IR and FT-Raman spectra of 6-chlorouracil: Molecular structure, tautomerism and solid state simulation. A comparison between 5-chlorouracil and 6-chlorouracil. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130, 653-668.

Pandey, P., Pant, C. K., Gururani, K., Arora, P., Kumar, S., Sharma, Y., Pathak, H. D., Mehata, M. S. (2013). Surface interaction of L-alanine on hematite: an astrobiological implication. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 43(4-5), 331-339.

Pedreira-Segade U., Feuillie C., Pelletier M., Michot L.J., Daniel I.(2016). Adsorption of nucleotides onto ferromagnesian phyllosilicates: significance for the origin of life. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 176: 81-95.

Pérez-Villa, A., Saitta, A. M., Georgelin, T., Lambert, J. F., Guyot, F., Maurel, M. C., Pietrucci, F. (2018). Synthesis of RNA nucleotides in plausible prebiotic conditions from ab initio computer simulations. *The journal of physical chemistry letters*, 9(17), 4981-4987.

Plötze M., Kahr G., Stengele R.H. (2003) Alteration of clay minerals gamma-irradiation effects on physicochemical properties. *Applied Clay Science* 23: 195–202.

Ponnamperuma, C., Lemmon, R. M., & Calvin, M. (1963). The radiation decomposition of adenine. *Radiation research*, 18(4), 540-551.

Poulet F., Bibring J.P., Mustard J.F., Gendrin A., Mangold N., Langevin Y., Arvidson R.E., Gondet B., Gomez C., the Omega Team (2005) Phyllosilicates on Mars and implications for early Martian climate. *Nature* 438: 623 – 627.

Pyne, A., & Suryanarayanan, R. (2001). Phase transitions of glycine in frozen aqueous solutions and during freeze-drying. *Pharmaceutical research*, 18(10), 1448-1454.

Qin, W., Zhao, D., & Guo, C. (1991). pH effect on structural character of uracil in aqueous solution studied by single-shot CARS. *Chemical physics letters*, 184(5-6), 387-390.

Rhaese, H. J. (1968). Chemical analysis of DNA alterations: III. Isolation and characterization of adenine oxidation products obtained from oligo- and monodeoxyadenylic acids treated with hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 166(2), 311-326.

Saladino, R., Crestini, C., Costanzo, G., Negri, R., & Di Mauro, E. (2001). A possible prebiotic synthesis of purine, adenine, cytosine, and 4 (3H)-pyrimidinone from formamide: implications for the origin of life. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9(5), 1249-1253.

Samuel, A. H., & Magee, J. L. (1953). Theory of radiation chemistry. II. Track effects in radiolysis of water. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6), 1080-1087.

Schmidt, K. H., & Ander, S. M. (1969). Formation and recombination of the hydronium ion (H_3O^+) and hydroxide in irradiated water. *The Journal of Physical Chemistry*, 73(9), 2846-2852.

Scholes, G., Ward, J. F., & Weiss, J. (1960). Mechanism of the radiation-induced degradation of nucleic acids. *Journal of molecular biology*, 2(6), 379-391.

Schwertmann, U., & Cornell, R. M. (2000). *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*. 2.ed. John Wiley & Sons.

Shanker, U., Bhushan, B., & Bhattacharjee, G. Kamaluddin (2011). Formation of nucleobases from formamide in the presence of iron oxides: implication in chemical evolution and origin of life. *Astrobiology*, 11(3), 225-233.

Shanker, U., Bhushan, B., Bhattacharjee, G. Kamaluddin (2012). Oligomerization of glycine and alanine catalyzed by iron oxides: implications for prebiotic chemistry. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 42(1), 31-45.

Shanker, U., Singh, G. Kamaluddin (2013). Interaction of aromatic amines with iron oxides: implications for prebiotic chemistry. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 43(3), 207-220.

Singh, J. S. (2013). FT-IR and Raman spectra, ab initio and density functional computations of the vibrational spectra, molecular geometries and atomic charges of uracil and 5-halogenated uracils (5-X-uracils; X= F, Cl, Br, I). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, 502-518.

Singh, J. S. (2015). FT-IR and Raman spectra, ab initio and density functional computations of the vibrational spectra, molecular geometries and atomic charges of uracil and 5-methyluracil (thymine). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 625-640.

Šponer, J. E., Šponer, J., & Fuentes-Cabrera, M. (2011). Prebiotic routes to nucleosides: a quantum chemical insight into the energetics of the multistep reaction pathways. *Chemistry-a European Journal*, 17(3), 847-854.

Sposito G. (1989). *The chemistry of soil*. Oxford University Press, New York.

Stevens M.A., Smith H.W., Brown G.B. (1959). Purine N-oxides. V. Oxides of adenine nucleotides. *Journal of the American Chemical Society* 81: 1734-1738.

Stevens, M. A., & Brown, G. B. (1958a). Purine N-Oxides. II. The Structure of Adenine N-Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(11), 2759-2762.

Stevens, M. A., Magrath, D. I., Smith, H. W., & Brown, G. B. (1958b). Purine N-Oxides. I. Mono-oxides of Aminopurines¹. *Journal of the American Chemical Society*, 80(11), 2755-2758.

Su X., Huang Q., Dang B., Wang X., Yu Z. (2011). Spectroscopic assessment of argon gas discharge induced radiolysis of aqueous adenine and thymine. *Radiation Physics and Chemistry* 80: 1343-1351.

Tang, K. C., Chen, C. L., Chuang, H. H., Chen, J. L., Chen, Y. J., Lin, Y. C., Shen, J. Y., Hu, W. P., Chou, P. T. (2011). A genuine intramolecular proton relay system undergoing excited-state double proton transfer reaction. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2(24), 3063-3068.

Tomasi, J., Mennucci, B., & Cancès, E. (1999). The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 464(1-3), 211-226.

Tyagi B., Chudasama C.D., Jasra R.V. (2006) Determination of structural modification in acid activated montmorillonite clay by FT-IR spectroscopy. *Spectrochimica Acta: Part A* 64: 273 – 278.

Valezi, D. F., Spadotto, J. C., Santos, L. G., Baú, J. P. T., Carneiro, C. E. A., Zaia, D. A. M., Costa, A.C.S., Solórzano, I.G., Di Mauro, E. (2017). Influence of Microstructure on the Magnetic Properties of Goethite (α -FeOOH). *Microscopy and Microanalysis*, 23(S1), 1922-1923.

Van Hemmen J.J., Bleichrodt J.F. (1971). The decomposition of adenine by ionizing radiation. *Radiation research* 46: 444 – 456.

Varshney, D. B., Kumar, S., Shalaev, E. Y., Sundaramurthi, P., Kang, S. W., Gatlin, L. A., & Suryanarayanan, R. (2007). Glycine crystallization in frozen and freeze-dried systems: effect of pH and buffer concentration. *Pharmaceutical research*, 24(3), 593-604.

Vieira, A. P., Berndt, G., de Souza Junior, I. G., Di Mauro, E., Paesano, A., de Santana, H., da Costa, A. C., Zaia, C. T. B., Zaia, D. A. (2011). Adsorption of cysteine on hematite, magnetite and ferrihydrite: FT-IR, Mössbauer, EPR spectroscopy and X-ray diffractometry studies. *Amino Acids*, 40(1), 205-214.

Wang, A., Freeman, J. J., Jolliff, B. L., Chou, I. M. (2006). Sulfates on Mars: A systematic Raman spectroscopic study of hydration states of magnesium sulfates. *Geochimica et cosmochimica acta*, 70(24), 6118-6135.

Wänke, H., Brückner, J., Dreibus, G., Rieder, R., & Ryabchikov, I. (2001). Chemical composition of rocks and soils at the Pathfinder site. In *Chronology and Evolution of Mars* (pp. 317-330). Springer, Dordrecht.

Weckhuysen B.M., Leeman H., Schoonheydt R.A. (1999). Synthesis and spectroscopy of clay intercalated Cu (II) bio monomer complexes: coordination of Cu (II) with purines and nucleotides. *Physical Chemistry and Chemical Physics* 1: 2875-2880.

Wetmore, S. D., Boyd, R. J., & Eriksson, L. A. (1998). Theoretical investigation of adenine radicals generated in irradiated DNA components. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(51), 10602-10614.

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

Yamamoto O., Fuji, I. (1986). Degradation of adenine in aqueous solution containing $^3\text{H}\text{H}\text{O}$. Comparison with ^{60}Co gamma-radiolysis. *Journal of radiation research* 27: 130 – 139.

Yamamoto, O. (1980). Adenine-N-oxide produced from adenine with gamma-rays and its binding to SH protein. *Journal of radiation research*, 21(3-4), 239-247.

Yang, L., Arora, K., Beard, W. A., Wilson, S. H., & Schlick, T. (2004). Critical role of magnesium ions in DNA polymerase β 's closing and active site assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 126(27), 8441-8453.

Zaia D.A.M. (2004) A review of adsorption of amino acids on minerals: Was it important for origin of life? *Amino acids* 27: 113 – 118.

Zaia D.A.M. (2012). Adsorption of amino acids and nucleic acid bases onto minerals: a few suggestions for prebiotic chemistry experiments. *International Journal of Astrobiology* 11: 229 – 234.

Zaia, D. A. (2012). Adsorption of amino acids and nucleic acid bases onto minerals: a few suggestions for prebiotic chemistry experiments. *International Journal of Astrobiology*, 11(4), 229-234.

Zaia, D. A., Zaia, C. T. B., & De Santana, H. (2008). Which amino acids should be used in prebiotic chemistry studies?. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 38(6), 469-488.

Zehner, H., Flossmann, W., Westhof, E. (1976). Formation of H-addition radicals in adenine derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 31(5-6), 225-231.

Anexos

Anexo I

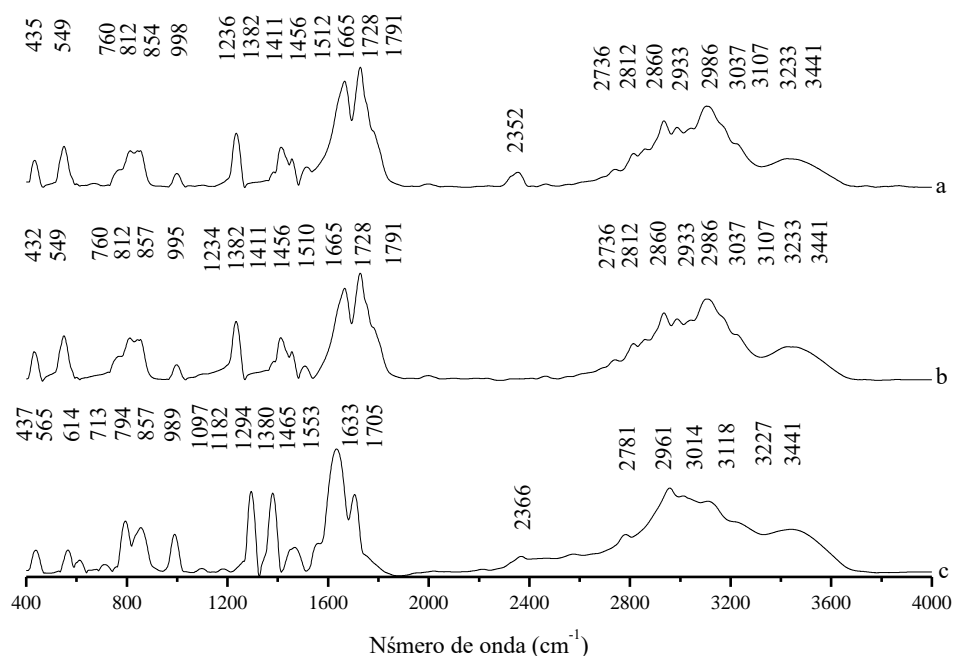


Figura 1. Espectros FT-IR obtido em KBr: **a)** uracila liofilizada de água ultra pura, **b)** uracila liofilizada de solução com pH 2,00 (linha); **c)** uracila liofilizada de solução com pH 12,0.

Espectros FT-IR das amostras de 400 a 4000 cm^{-1} foram obtidos utilizando um espectrofotômetro FT-IR da Shimadzu modelo IR PRESTIGE-21. Uma resolução de 4 cm^{-1} e 100 varreduras foram usadas para obter o espectro. Os espectros foram analisados utilizando o programa Origin (8.0, 2001).

Anexo II

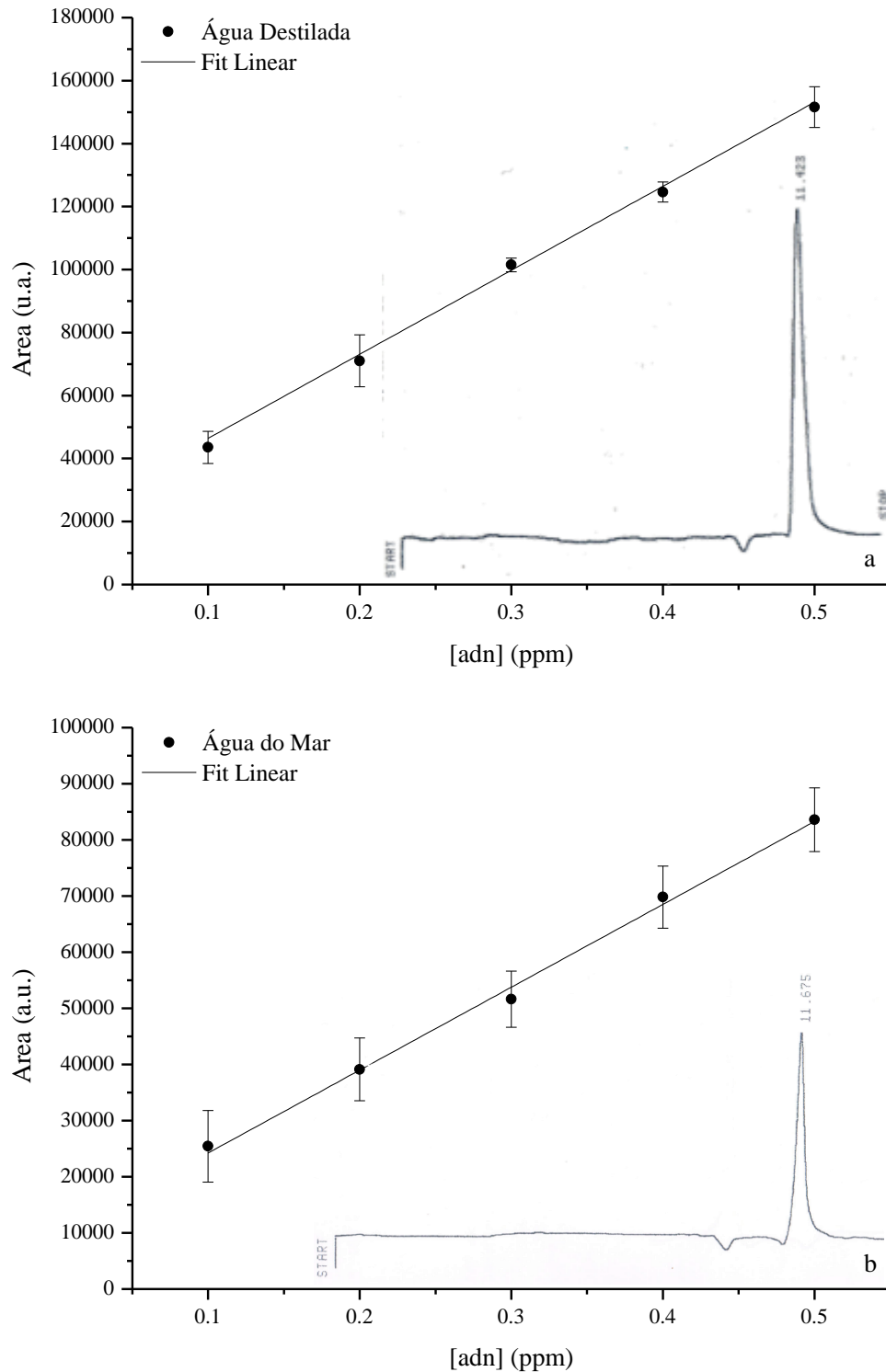


Figura. Curva analítica de adenina em solução. Determinação realizada por cromatografia (HPLC): **a)** água destilada, Coeficiente de determinação igual a $R^2=0,998$, equação da reta $y = 269697x + 17750$; **b)** água do mar, Coeficiente de determinação igual a $R^2=0,997$, equação da reta = $147026x + 9802,7$.

Anexo III

Tabela. Atribuição por tentativa das amostras de glicina.

Atribuição	Alfa	Beta	Gama	Glicina	Lio	A		B		C		Ext A		Ext B		Ext C	
						I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Chernobai, 2007	α	β	γ	α/γ	$\alpha/\beta/\gamma$	α/γ	α/γ	α	α	α	α	$\alpha/\beta/\gamma$	$\alpha/\beta/\gamma$	$\alpha/\beta/\gamma$	$\alpha/\beta/\gamma$	$\alpha/\beta/\gamma$	$\alpha/\beta/\gamma$
$\nu(\text{NH}\dots\text{O})$	3165	3188	3100	3158	3175	-	-	3150	3150	3149	3149	3175	3175	3175	3175	3175	3175
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	3007	3006	2999	3008	3008	3007	3007	3008	3007	3006	3006	-	-	-	-	-	-
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2969	2969	2962	2970	2972	2961	2960	2970	2968	2968	2969	2980	2980	2980	2980	2980	2980
Overtone/ composite	2128	2136	2172	2121	2130	-	-	2111	2116	2115	2114	2130	2130	2130	2130	2130	2130
$\delta_{\text{a}}(\text{NH}_3)$	1611	1655	1663 1632	1607	1612 1662	1668	1666	1605	1610	1606	1606	1661	1661	1661	1661	1661	1661
$\nu_{\text{a}}(\text{COO})$	1584	1606	1580	1579	1591	1574	1574	1578	1580	1580	1583	1593	1593	1593	1593	1593	1593
$\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3)$	1513	1543	1496	1514	1517	1496	1494	-	-	-	-	1514	1514	1514	1514	1514	1514
	1503	1526	-	1499	1505	-	-	1499	1499	1449	1501						
$\delta(\text{CH}_2)$	1444	1445	1437	1443	1444	1440	1439	1443	1442	1441	1443	1444	1444	1444	1444	1444	1444
$\nu_{\text{s}}(\text{COO})$	1414	1416	1397	1408	1410	1409	1408	1407	1408	1408	1406	1413	1413	1413	1413	1413	1413
$\omega(\text{CH}_2)$	1333	1336	1336	1332	1333	1391	1391	1328	1331	1328	1329	1334	1334	1334	1334	1334	1334
$\tau(\text{CH}_2)$	1314	-	1326	1311	1310	1330	1329	1312	1311	1312	1312	1308	1308	1308	1308	1308	1308
$\rho(\text{NH}_3)$	1132	1335	1155	1131 1156	1134	1126 1155	1127 1154	1031	1131	1033	1031	1134	1134	1134	1134	1134	1134
	1112	1120	1129	1111	1117	1112	1111	1110	1110	1110	1110	1117	1117	1117	1117	1117	1117
$\nu_{\text{a}}(\text{CCN})$	1034	1041	1044	1033	1039	1034	1033	1033	1033	1033	1032	1040	1040	1040	1040	1040	1040
$\rho(\text{CH}_2)$	911	916	930	910 930	914	910 928	909 926	908	908	907	908	915	915	915	915	915	915
$\nu(\text{CC})$	893	894	892	892	892	890	891	892	891	892	893	894	894	894	894	894	894

ν , estiramento; β , *bending* no-plano; γ , *bending* fora do plano; δ , deformação; ρ , rocking; τ , twisting.