

**Estudos com nucleobases e nucleósidos no âmbito da
evolução pré-biológica**

Catarina de Jesus Pinto Gonçalves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química

Orientador: Professor Doutor José Armando Luísa da Silva

Júri

Presidente: Professor Doutor Mário Nuno de Matos Sequeira Berberan e Santos

Orientador: Professor Doutor José Armando Luísa da Silva

Vogal: Professora Doutora Zita Carla Torrão Pinto Martins

Outubro 2019

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a orientação do Professor Doutor José Armando Luísa da Silva, a quem agradeço todo o apoio, dedicação e constantes sugestões de melhoria ao longo desta jornada.

Agradeço à Doutora Vânia André a ajuda e disponibilidade para a realização dos estudos de difração de raios X de pós, bem como a realização dos estudos de difração de raio X de cristal único. Às restantes colegas do laboratório de raio X agradeço a constante simpatia demonstrada.

Agradeço à Mestre Maria Júlio pela disponibilidade para realizar os estudos de espectroscopia de refletância difusa.

Agradeço à Mestre Ana Franco a amizade demonstrada desde o início deste trabalho laboratorial, bem como toda a ajuda disponibilizada ao longo do mesmo, com especial ênfase na disponibilidade para realizar os estudos de ressonância magnética nuclear. Agradeço à Glória Estrela a companhia e amizade, não só durante o trabalho laboratorial, mas também ao longo de todo o Mestrado em Química.

Por fim, o meu mais sincero agradecimento aos meus amigos e família pelo apoio incondicional ao longo do curso, em especial aos meus pais e ao meu irmão, sem os quais este percurso não teria sido possível.

Resumo

A origem da vida é uma das questões mais debatidas pela Humanidade. A presença de bases nitrogenadas em condritos carbonáceos sugere que estes constituintes do material genético teriam sido originados no cosmos e posteriormente transportados até à Terra através dos meteoritos. Na primeira parte deste trabalho testaram-se modelos de degradação da guanosina, adenosina e citidina que poderiam ter resultado da energia libertada aquando do impacto meteorítico na atualidade. Para tal, fez-se reagir os nucleósidos referidos, principalmente, com sais inorgânicos.

As amostras contendo os nucleósidos supracitados foram tratadas por via mecanoquímica na presença de iões mais comuns no ambiente pré-biológico, nomeadamente os carbonatos, também presentes nos condritos carbonáceos. Após a preparação, as amostras foram analisadas por PXRD e em seguida foram solubilizadas em solução aquosa. Posteriormente, as soluções foram colocadas a evaporar sob radiação solar, bem como na sua ausência, para compreender o efeito desta no processo reacional. A obtenção de guanina hidrociorada mono-hidratada, após exposição à radiação solar, de uma solução ácida de guanosina e carbonato de magnésio (na proporção 2:1), constitui uma evidência a favor da hipótese de degradação deste nucleósido na respetiva base nitrogenada.

Na segunda parte deste trabalho prepararam-se amostras de guanosina, adenosina e citidina com hidroxiapatite, a fonte de fosfato mais abundante na Terra, para estudar a possibilidade de fosforilar estes nucleósidos. A análise ^{31}P NMR das referidas amostras não permitiu obter resultados conclusivos, o que se poderá dever à baixa solubilidade da hidroxiapatite.

Palavras chave: Química pré-biótica, guanina, guanosina, adenosina, citidina, reações de fosforilação

Abstract

The origin of life is one of humanity's biggest quests. The presence of nucleobases in carbonaceous chondrites suggests that these components of the genetic material would have been originated in the cosmos and later brought to Earth by meteorites. In the first part of this work, the possibility of decomposing, nowadays, guanosine, adenosine and cytidine, as a consequence of the energy release due to meteoritic impact, was studied. The samples containing the nucleosides were prepared with some inorganic salts.

Samples containing the above-mentioned nucleosides were prepared by mechanochemical procedures with the most common ions in the prebiological environment, such as carbonates, that are also detected in carbonaceous chondrites. The samples produced by mechanochemistry were analysed by PXRD. To understand the role of solar radiation in the reactions, aqueous solutions were placed both in presence and absence of sunlight. Monohydrate hydrochloride guanine was obtained after solar exposure of an acidic solution of guanosine and magnesium carbonate (in proportion 2:1), proving this way that the degradation is, indeed, possible.

Samples containing guanosine, adenosine and cytidine with hydroxyapatite, the most abundant phosphate source on Earth, were tested in order to study the possibility of their phosphorylation. ³¹P NMR analyses of the above-mentioned samples were not conclusive, which may be related to hydroxyapatite's limited solubility.

Key words: Prebiotic Chemistry, guanine, guanosine, adenosine, cytidine, phosphorylation reaction

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice geral	v
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	ix
Índice de anexos	x
Abreviaturas	xi

Índice geral

Capítulo 1: Surgimento da vida na Terra	1
1.1 Hipótese <i>RNA World</i>	4
1.2 Estrutura do RNA e formação dos seus constituintes	5
1.2.1 Considerações gerais sobre iões	10
Capítulo 2: Objetivos do trabalho experimental	12
Capítulo 3: Parte experimental	14
3.1 Materiais e Instrumentos	14
3.2 Procedimento experimental	15
3.2.1 Degradação de ribonucleósidos nas respetivas bases nitrogenadas	15
3.2.2 Reações de fosforilação	17
Capítulo 4: Estudos com guanina	18
4.1 Via mecanoquímica	18
4.2 Soluções aquosas sem adição de ácido ou base	20
4.3 Soluções aquosas em meio básico	21
4.4 Soluções aquosas em meio ácido	27
Capítulo 5: Degradação de ribonucleósidos nas respetivas bases nitrogenadas	32
5.1 Via mecanoquímica	32
5.2 Soluções aquosas sem adição de ácido ou base	37
5.3 Soluções aquosas em meio ácido	44
Capítulo 6: Estudos preliminares de reações de fosforilação	48
Capítulo 7: Considerações finais e prospetivas	50

Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática da experiência de Pasteur (adaptada ¹⁵). a) representa a situação em que não há quebra do gargalo e b) representa a situação em que há quebra do gargalo.....	2
Figura 2 – Relação entre DNA, RNA e proteínas (adaptada ^{46,47,48}) a) representa a replicação (permite obter uma cópia da molécula de DNA); b) a transcrição (conversão da molécula de DNA numa molécula de RNA); c) a transcrição reversa (conversão da molécula de RNA numa molécula de DNA) e d) a tradução (leitura da molécula de RNA e formação da respetiva proteína).....	4
Figura 3 – Representação esquemática da furanose (adaptada ⁵⁹). A ligação ondulada representa a ligação ao carbono anomérico. O grupo -OH tanto pode estar para baixo (forma α) como para cima (forma β). A forma β é a que ocorre nas moléculas biológicas.....	6
Figura 4 – Representação esquemática das bases nitrogenadas. 1 – adenina; 2 – guanina; 3 – citosina; 4 – uracilo; 5 – timina (adaptada ⁶⁹).....	7
Figura 5 – Representação (a azul) dos locais de tautomerização disponíveis na molécula de guanina (adaptada a partir da figura 4)	7
Figura 6 – Representação esquemática da guanosina, nucleósido formalmente resultante da reação da guanina (representada a azul) com a ribose (adaptada ⁷⁴)	8
Figura 7 – Tautómero mais comumente adotado pela guanina (adaptada a partir da figura 4). A azul está representado o grupo aceitador e a laranja os grupos doadores de átomos de hidrogénio	8
Figura 8 – Emparelhamento complementar das bases guanina/citosina (adaptada ⁷⁵). A azul está representada a guanina e a laranja a citosina.....	8
Figura 9 – Representação esquemática de um ribonucleótido (adaptada ⁵⁹). A azul encontra-se representado o grupo fosfato, a laranja o açúcar e a verde a base nitrogenada (no caso, adenina)	9
Figura 10 – Análise PXRD da primeira moagem da amostra Guan/Mg2 (a verde). Os difratogramas da guanina e do MgCO ₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos	18
Figura 11 – Análise PXRD da primeira moagem da amostra Guan/Li1 (a verde). Os difratogramas da guanina e do Li ₂ CO ₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos	19
Figura 12 – Análise DRIFT da amostra Guan/Ca4 (a vermelho). Os espectros da guanina e do sulfato de cálcio apresentam-se a azul e verde, respetivamente, para efeitos comparativos.	23
Figura 13 – Tautómeros mais comuns da guanina em meio básico. 1 – para a espécie monoaniónica; 2 – para a espécie dianiónica (adaptada ⁷¹)	26
Figura 14 – Tautómeros mais comuns da guanina em meio ácido. 1 – para a espécie dicatiónica; 2 – para a espécie monocatiónica (adaptada ⁷¹)	27

Figura 15 – Estrutura do sulfato de guanina hemi-hidratada. 1 - Estrutura da guanina, a verde apresentam-se os átomos de nitrogénio, a amarelo os de carbono e a vermelho o de oxigénio; 2 - Molécula de água partilhada com outro sulfato de guanina hemi-hidratada da mesma célula unitária; 3 - Estrutura do sulfato, a vermelho apresentam-se os átomos de oxigénio e a amarelo o átomo de enxofre. Os átomos de hidrogénio foram, em todos os casos, omitidos para facilitar a compreensão	29
Figura 16 – Estrutura obtida após a reação de guanosina com carbonato de magnésio. 1 – Ião magnésio (a roxo) coordenado a seis moléculas de água; 2 – Estrutura formalmente derivada da guanina onde os átomos de nitrogénio estão representados a verde, os de carbono a amarelo e o de oxigénio a vermelho. Os átomos de hidrogénio foram omitidos para facilitar a compreensão	32
Figura 17 – Análise PXRD da primeira moagem da amostra Gs/Mg2 (a verde). Os difratogramas da guanosina e do MgCO ₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos	34
Figura 18 – Análise PXRD da amostra Gs/Mg3 (a verde) após 20 minutos no moinho de bolas. Os difratogramas da guanosina e do MgCO ₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos	35
Figura 19 – Análise PXRD da amostra Gs/Ca1 (a verde). Os difratogramas da guanosina e do CaCO ₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos	35
Figura 20 – Análise PXRD da primeira moagem da amostra Ads/Mg1 (a verde). Os difratogramas da adenosina e da hidromagnesite estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos	36
Figura 21 – Análise PXRD da primeira moagem da amostra Ads/Mg2 (a verde). Os difratogramas da adenosina e do MgCO ₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos	36
Figura 22 – Consistência e cor obtidas após moagem da amostra Gs/Mg6.....	39
Figura 23 – Primeiro espetro ¹ H NMR da amostra Gs/Mg5 (obtido após a preparação da amostra)..	41
Figura 24 – Estrutura da guanina hidrocloreto mono-hidratada obtida após solubilização em meio ácido de uma amostra de guanosina com carbonato de magnésio. A verde apresentam-se os átomos de nitrogénio, a amarelo os de carbono, a vermelho os de oxigénio, a roxo o cloreto e a rosa os hidrogénios	45

Índice de tabelas

Tabela 1 – Dados sobre as amostras de guanina preparadas por via mecanoquímica	18
Tabela 2 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanina em meio neutro.....	20
Tabela 3 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanina em meio básico.....	22
Tabela 4 – Atribuição das bandas mais representativas do espectro de IR da amostra Guan/Ca4 ¹¹⁰ (δ refere-se à flexão no plano e ν ao estiramento)	24
Tabela 5 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanina (preparadas por via mecanoquímica) em meio básico	25
Tabela 6 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanina em meio ácido (utilizando HCl)	28
Tabela 7 – Dados do cristal de sulfato de guanina hemi-hidratada e valores utilizados para o seu refinamento.....	30
Tabela 8 – Dados do cristal cuja estrutura se apresenta na figura 16, e valores utilizados para o seu refinamento.....	33
Tabela 9 – Dados sobre as amostras preparadas por via mecanoquímica	34
Tabela 10 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanosina (preparadas por via mecanoquímica) em meio tendencialmente neutro.....	39
Tabela 11 – Dados sobre a solubilização de amostras de adenosina e citidina em meio tendencialmente neutro.....	42

Índice de anexos

Anexo A – Caracterização da hidroxiapatite

64

Abreviaturas

Ade – Amostras contendo adenina

Ads – Amostras contendo adenosina

ATP – Adenosina trifosfato (do inglês *Adenosine TriPhosphate*)

Cit – Amostras contendo citidina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *DeoxyriboNucleic Acid*)

DRIFT – Espectroscopia de Refletância Difusa (do inglês *Difuse Reflectance Infrared Fourier Transform*)

FTIR – Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform InfraRed*)

Guan – Amostras contendo guanina

Gs – Amostras contendo guanosina

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

IR – Infravermelho (do inglês *InfraRed*)

NMR – Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*)

PXRD – Difração de Raios X de pós (do inglês *Powder X-Ray Diffraction*)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês *RiboNucleic Acid*)

SCXRD – Difração de Raios X de cristal único (do inglês *Single Crystal X-Ray Diffraction*)

Capítulo 1: Surgimento da vida na Terra

Estima-se que o sistema solar, bem como a Terra, se tenha formado há, aproximadamente, 4,6 mil milhões de anos^{1,2}. De entre o Universo conhecido, este sistema revela-se bastante especial, na medida em que é o único onde existe um planeta, a Terra, em que se conhece vida. No entanto, o momento do aparecimento da vida não é consensual, alguns autores situam-no há cerca de 3,5 mil milhões de anos^{2,3}, ao passo que outros admitem ter ocorrido mais cedo, entre os 4,1 e os 4,2 mil milhões de anos¹.

A Terra possui condições específicas que permitiram o surgimento de vida e a sua evolução até aos dias de hoje. De entre estas destaca-se a existência de água no estado líquido^{1,3}, essencial à vida na medida em que é o constituinte maioritário dos seres vivos, bem como a localização do planeta em relação ao Sol, pois permite receber a energia necessária para a realização de processos como a fotossíntese. Para além disso, a proximidade a este astro, garante, ainda, a manutenção de valores de temperatura adequados à ocorrência de vida em diversas regiões do planeta⁴, os quais são também assegurados graças à presença de gases com efeito de estufa na atmosfera (como o vapor de água e o dióxido de carbono)^{5,6}. A presença de planetas gigantes (como Júpiter) relativamente próximos da Terra confere-lhe uma proteção adicional^{7,8}, já fornecida pela atmosfera⁹, contra os meteoroides (estes, quando alcançam a superfície terrestre, passam a ser designados meteoritos¹⁰). As várias camadas da atmosfera vão obriga-los a abrandar e desintegrarem-se antes de atingirem a superfície terrestre. Salienta-se, igualmente, a existência de um campo magnético no planeta, que atenua os efeitos das tempestades solares e de radiação nociva para a ocorrência de Vida¹¹.

Os supracitados dados explicam a existência e manutenção de vida no planeta Terra, surgindo, portanto, a questão acerca da sua origem. A resposta é, no entanto, mais complicada do que possa parecer à primeira vista. Desde a Antiguidade Clássica muitas hipóteses têm vindo a ser desenvolvidas. Aristóteles admitia que a vida surgira por geração espontânea e assentava a sua hipótese no pressuposto de que a vida resultara da interação entre os quatro elementos: água, ar, terra e fogo, que se teriam juntado a um calor vital, a alma, para formar vida a partir de matéria não viva¹².

A partir do século XVII novos avanços científicos começaram a pôr em causa esta hipótese, tomando particular expressão no século XIX com as experiências de Pasteur. Nestas, Pasteur ferveu um líquido, esterilizando-o. Este líquido continha nutrientes e estava num recipiente com gargalo aberto para o exterior. A formação de micro-organismos no líquido só ocorreu quando se partiu o gargalo (como se mostra na figura 1), provando-se assim que os seres vivos não se originavam espontaneamente a partir de matéria inorgânica, como era admitido, mas antes devido a contaminações por outros seres vivos^{13,14}.

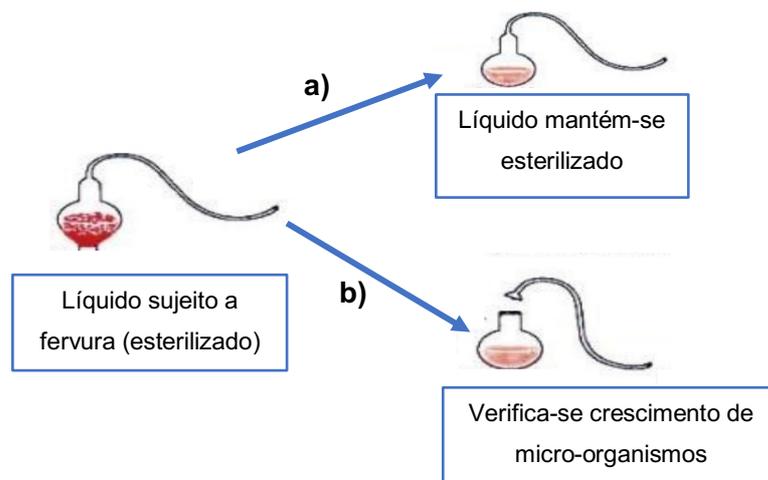


Figura 1 – Representação esquemática da experiência de Pasteur (adaptada¹⁵). **a)** representa a situação em que não há quebra do gargalo e **b)** representa a situação em que há quebra do gargalo

Os resultados obtidos por Pasteur, a par com o progressivo desenvolvimento do conhecimento científico, demonstraram a necessidade de formular novas hipóteses para explicar a origem da vida. Uma destas hipóteses, conhecida como Panspermia, surgiu em 1908, proposta por Arrhenius^{16,17}. Nesta admite-se que a vida terá sido gerada no cosmos e posteriormente trazida para o planeta Terra através dos cometas, meteoritos e partículas interplanetárias. Esta hipótese responde à questão sobre como a vida terá chegado à Terra, mas não à forma como terá sido originada¹².

A constante evolução do conhecimento científico, bem como a melhoria dos equipamentos de pesquisa, são fatores que foram conduzindo ao desenvolvimento de novas hipóteses sobre a origem da vida. Oparin¹⁸ e Haldane¹⁹ propuseram, de forma independente, na década de 20 do século XX, a hipótese da vida ter surgido a partir de uma mistura de moléculas pequenas nas condições pré-biológicas, onde se destaca a ação da radiação solar, bem como a atmosfera com caráter redutivo¹. Na década de 1950, as experiências de Miller e Urey vieram confirmar esta hipótese ao sintetizar aminoácidos, ácidos hidroxilos e ureia a partir de moléculas inorgânicas como o amoníaco, o vapor de água e o hidrogénio molecular, bem como o metano, que seriam os constituintes da atmosfera primitiva^{20,21}. Nesta experiência os autores recorreram a descargas elétricas para simular os relâmpagos presentes na atmosfera primitiva^{12,22}.

Mais tarde, as evidências de moléculas orgânicas no cosmos²³, bem como as críticas tecidas à Panspermia, conduziram ao estabelecimento da hipótese da Neopanspermia. A Panspermia apresentava, como argumento a favor, uma justificação plausível para o curto período de tempo, na escala geológica, verificado entre o arrefecimento da Terra primitiva (que terá ocorrido pouco depois da sua formação) e o aparecimento dos primeiros micro-organismos¹. No entanto, as condições inóspitas do espaço cósmico tornariam pouco provável a sobrevivência de organismos

vivos. Assim, a Neopanspermia sugere que, ao invés de transportarem vida, os corpos interplanetários trouxeram os blocos que permitiram originar vida, como seja o 2,3-diidroxipropanal (ou gliceroaldeído como é mais conhecido na nomenclatura corrente), a cianamida, o diaminometanal (ou ureia como é mais conhecida na nomenclatura corrente), o ciano-acetaldeído e o ciano-etino (ciano-acetileno na nomenclatura corrente), bem como alguns constituintes de moléculas fundamentais, como as bases nitrogenadas^{1,3,16,24,25,26,27}. Desta forma ultrapassa-se o problema verificado, algum tempo mais tarde, de que as condições atmosféricas utilizadas na experiência de Miller e Urey não seriam consistentes com a atmosfera terrestre primitiva²⁸. Pesquisas no ramo da Astrobiologia determinaram ainda que algumas luas de alguns planetas gigante do Sistema Solar se encontram cobertas por uma camada de gelo que poderá conter moléculas orgânicas^{3,29}. Acredita-se que a interação dos raios ultravioleta, bem como dos raios cósmicos de alta energia, com esta camada de gelo, poderia ter originado biomoléculas, fenómeno este que poderia, igualmente, ter ocorrido noutros corpos celestes³⁰. Experiências recentes vieram confirmar esta hipótese ao sintetizar todas as bases nitrogenadas, à exceção da guanina, recorrendo às condições experimentais previamente descritas³¹.

Ao longo da História outras hipóteses têm vindo a ser sugeridas para explicar a origem da vida no planeta Terra^{32,33,34,35}, nomeadamente, a hipótese de a vida ter surgido através de reações químicas nas fontes hidrotermais^{1,3,16} ou de se ter originado durante o período do intenso bombardeio tardio (*Late Heavy Bombardment*, na nomenclatura internacional)^{36,37}.

Atualmente a hipótese mais aceite nos meios científicos, para explicar a origem da vida no planeta Terra, (e usada ao longo deste trabalho) é a do *RNA World*. Nesta hipótese, proposta pela primeira vez em 1962³⁸, admite-se que o ácido ribonucleico ou RNA (*RiboNucleic Acid*, na nomenclatura internacional) se formou primeiro, conduzindo posteriormente ao aparecimento do ácido desoxirribonucleico ou DNA (*DeoxyriboNucleic Acid*, na nomenclatura internacional) e consequentemente à vida como se conhece hoje^{12,39,40,41,42}. Esta hipótese é abordada em detalhe na secção 1.1 deste trabalho.

Ressalve-se, ainda, que a Neopanspermia e a hipótese do *RNA World* não entram em contradição, uma vez que esta última não especifica a proveniência das moléculas que constituem o material genético. Assim, estas poderiam ter sido originadas abioticamente noutro local do Universo e posteriormente ter chegado à Terra nos meteoritos²⁷. A presença de moléculas orgânicas em condritos carbonáceos, o tipo de meteoritos mais primitivo²⁴, constitui um argumento a favor da proveniência extraterrestre dos blocos fundamentais. Este tipo de meteoritos está classificado em oito grupos, três dos quais apresentam bases nitrogenadas (que são as subunidades que constituem o RNA e DNA) de proveniência extraterrestre, nomeadamente, adenina, guanina e uracilo (esta última é exclusiva do RNA)^{1,24}. O uracilo foi detetado somente no meteorito Murchison⁴³, em 2007, no entanto, em 2011, dois co-autores^{24,26} levantaram questões sobre a ocorrência desta base nitrogenada no meteorito em causa. Tal deve-se à presença de ácidos

carboxílicos extraterrestres, ricos em ^{13}C , na amostra, que podem co-eluir, alterando assim os desvios medidos para o uracilo^{24,44}. Desta forma, a ocorrência de uracilo extraterrestre nos condritos carbonáceos é, ainda, um tema envolto em controvérsia em alguns sectores da comunidade científica⁴⁵. De entre as restantes bases nitrogenadas detetadas nos condritos carbonáceos, adenina e guanina, a guanina é tipicamente mais abundante que a adenina⁴⁵. As pirimidinas (grupo de bases nitrogenadas em que se inclui o uracilo) apresentam uma resistência inferior à radiólise, quando comparadas com as purinas (grupo de bases nitrogenadas constituído pela adenina e guanina), o que poderá justificar que estejam menos presentes nos meteoritos, ou até abaixo dos limites de deteção⁴⁵. Desta forma, não é de excluir a hipótese de também estas bases nitrogenadas terem tido origem extraterrestre.

1.1 Hipótese *RNA World*

A informação genética dos organismos vivos atuais, necessária para a produção proteica, encontra-se codificada pelo DNA. O RNA é utilizado como intermediário entre o DNA e as proteínas, como se pode comprovar por observação da figura 2².

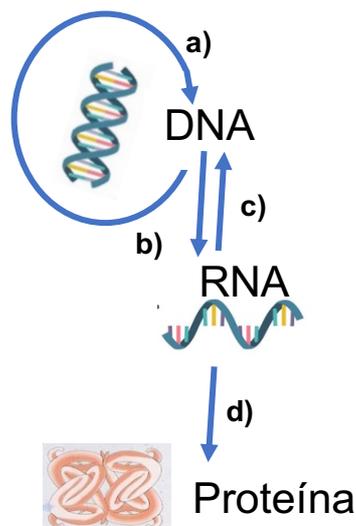


Figura 2 – Relação entre DNA, RNA e proteínas (adaptada^{46,47,48}) **a)** representa a replicação (permite obter uma cópia da molécula de DNA); **b)** a transcrição (conversão da molécula de DNA numa molécula de RNA); **c)** a transcrição reversa (conversão da molécula de RNA numa molécula de DNA) e **d)** a tradução (leitura da molécula de RNA e formação da respetiva proteína)

A hipótese do *RNA World* admite que os organismos evoluíram a partir de um sistema mais simples onde apenas o RNA era utilizado para armazenar informação e fabricar proteínas. Ao nível do armazenamento de informação destaca-se, como prova da precedência do RNA em relação ao DNA, a existência de vírus cujo material genético é apenas constituído por RNA^{2,49}, bem como as evidências da formação do DNA a partir de precursores do RNA⁵⁰. Já ao nível da formação proteica, o papel inicial do RNA é fundamentado pelo facto de este poder atuar como

catalisador na forma de ribozima^{49,51}. No entanto, é admissível ter sido a sua baixa atividade catalítica que impulsionou o desenvolvimento das enzimas⁵². Este facto, associado à sua baixa estabilidade em meio aquoso⁵⁰, foi crucial para o desenvolvimento do sistema atual (DNA, RNA e proteínas) em que a informação está armazenada no DNA e a atividade catalítica é, sobretudo, da responsabilidade das proteínas, sendo o principal papel do RNA o de intermediário entre estas duas estruturas.

1.2 Estrutura do RNA e formação dos seus constituintes

O RNA é uma cadeia poli-ribonucleótida que resulta da junção de vários ribonucleótidos⁵³. A hipótese do *RNA World* admite que se formaram, numa primeira instância, os ribonucleótidos, e estes terão, posteriormente, reagido para formar a cadeia polimérica. Os ribonucleótidos teriam sido formados pela reação entre os seus três constituintes, o fosfato inorgânico, a ribose e uma das quatro bases nitrogenadas. O modo como este processo terá ocorrido não está, ainda, totalmente clarificado⁵⁴.

O fosfato pode ligar-se aos ribonucleósidos (estrutura constituída pela ribose e por uma das quatro bases nitrogenadas) através de reações de fosforilação, que são, por definição, reações entre um grupo fosfato e uma molécula orgânica. No entanto, estas reações são termodinamicamente desfavoráveis em meio aquoso, fazendo com que a reação de hidrólise seja habitualmente preponderante^{55,56}. A ligação do fosfato aos ribonucleósidos no mundo pré-biológico pressupõe a existência de uma fonte de fosfato. A fonte mais significativa de fosfato no planeta Terra é a apatite, mineral que pode surgir na forma de fluorapatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, cloroapatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$, ou hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e que se caracteriza por apresentar baixa solubilidade em meio aquoso, bem como baixa reatividade, o que poderá ter dificultado a sua utilização nas reações pré-bióticas^{1,57}.

A ribose é um açúcar do grupo das pentoses, que pode existir quer na forma linear, quer na forma de anel. Neste último caso o anel tanto pode ser de seis membros, caso em que se designa piranose, como de cinco membros, caso em que se designa furanose. Tanto a piranose como a furanose podem existir nas suas formas α e β ²². Na figura 3 encontra-se a representação esquemática da furanose, que é a forma em que a ribose ocorre nas moléculas biológicas atuais. Esta forma ocorre não só nos ácidos nucleicos mas também noutras biomoléculas como o ATP (adenosina trifosfato)⁵⁸.

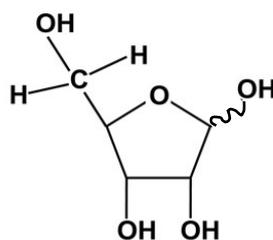


Figura 3 – Representação esquemática da furanose (adaptada⁵⁹). A ligação ondulada representa a ligação ao carbono anomérico. O grupo -OH tanto pode estar para baixo (forma α) como para cima (forma β). A forma β é a que ocorre nas moléculas biológicas

A síntese da ribose foi conseguida, em 1861, por Butlerow⁶⁰, que obteve uma mistura de açúcares complexos partindo da polimerização do formaldeído. A ribose aparece na mistura final como produto minoritário (com rendimento inferior a 1%), o que é desvantajoso para a hipótese do *RNA World*¹. Para além disso esta molécula é pouco estável (apresenta um tempo de semivida, a pH 7 e 100 °C, de apenas 73 minutos), logo, a sua utilização em reações pré-biológicas pressupõe que seja estabilizada previamente^{13,22}.

A ribopiranosose é a forma mais comum de estabilização da ribose. Este confórmero tende a ocorrer, maioritariamente, em meio aquoso, quer a ribose se encontre livre ou na presença de aniões mais correntes na hidrosfera líquida, como seja o cloreto, brometo e sulfato⁶¹, estando também descrita a estabilização da ribose como ribopiranosose, no estado sólido, quando em presença de cloreto de céσιο. Este caso revela-se particularmente importante na medida em que a ribopiranosose complexa com o ião metálico⁶².

Uma vez que nos organismos vivos a ribose ocorre na forma de furanose, importa perceber como é que este confórmero poderá ter sido estabilizado no mundo pré-biótico. Estão descritos casos de estabilização da ribose na forma de ribofuranose em meio aquoso quando em presença de borato^{13,22,63} e no estado sólido quando em presença de cloreto de cálcio⁶⁴. No caso do ião cálcio, as suas interações relativamente fortes com os açúcares constituem a principal justificação para a estabilização da ribose⁶². A par do ião cálcio, também os iões resultantes dos lantanídeos (conhecidos como Terras Raras) tendem a estabelecer relações relativamente fortes com os açúcares, estando descritos complexos de ribopiranosose em conjugação com iões praseodímio, lantânio, cério, neodímio e európio^{64,37,65,66,67,68}.

Os nucleótidos são, ainda, constituídos por uma das quatro bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina ou uracilo (no caso do DNA o uracilo é substituído pela timina). A adenina e a guanina pertencem à classe das purinas, ao passo que a citosina, o uracilo e a timina pertencem à classe das pirimidinas. A figura 4 apresenta a representação esquemática das bases nitrogenadas referidas⁶⁹.

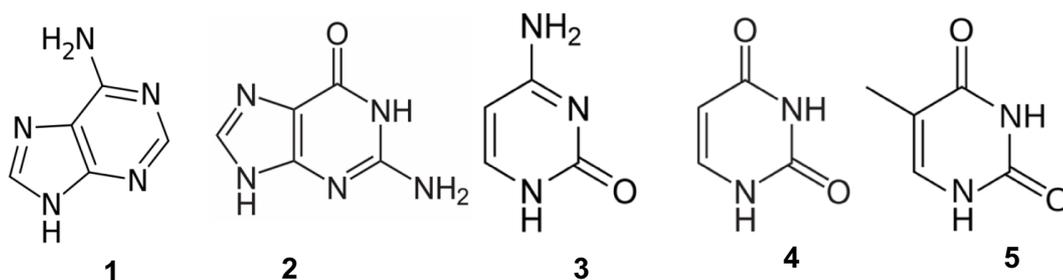


Figura 4 – Representação esquemática das bases nitrogenadas. 1 – adenina; 2 – guanina; 3 – citosina; 4 – uracilo; 5 – timina (adaptada⁶⁹)

A guanina é uma base nitrogenada que não está confinada aos ácidos nucleicos, podendo ocorrer na forma cristalina nos mais variados seres vivos. A título de exemplo destaca-se a sua presença nas escamas dos peixes ósseos, conferindo-lhes um aspeto lustroso que garante camuflagem de diversos ângulos^{70,71,72}. Dada a sua provável relevância em termos pré-bióticos, é conveniente analisar com maior detalhe as propriedades físicas e químicas desta base nitrogenada, bem como do respetivo ribonucleósido, a guanosina.

Do ponto de vista das propriedades físicas a guanina é a base nitrogenada com maior número de formas tautoméricas. Tautómeros são compostos com a mesma composição química que diferem na posição de, pelo menos, um hidrogênio⁷³. A guanina pode apresentar até 20 tautómeros, uma vez que possui três locais para a tautomerização, identificados pelos círculos a azul na figura 5.

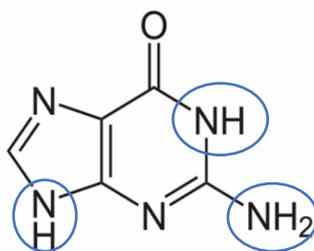


Figura 5 – Representação (a azul) dos locais de tautomerização disponíveis na molécula de guanina (adaptada a partir da figura 4)

Quando incorporada num nucleósido, a guanina vê o seu número de formas tautoméricas reduzir-se de 20 para 10, pois os locais de tautomerização reduzem-se de três para dois. Tal deve-se à ligação do derivado do açúcar ao átomo de nitrogénio 9, como se pode observar na figura 6. De entre as diversas formas tautoméricas a mais comumente adotada pela guanina corresponde à ilustrada na figura 7⁷⁰.

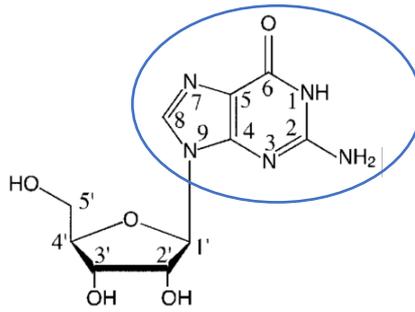


Figura 6 – Representação esquemática da guanosina, nucleósido formalmente resultante da reação da guanina (representada a azul) com a ribose (adaptada⁷⁴)

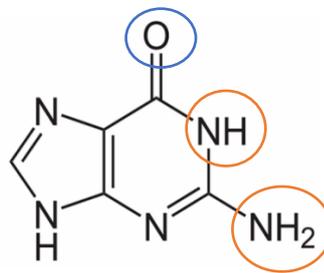


Figura 7 – Tautómero mais comumente adotado pela guanina (adaptada a partir da figura 4). A azul está representado o grupo aceitador e a laranja os grupos doadores de átomos de hidrogénio

A guanina possui um grupo aceitador de átomos de hidrogénio (constituído pelo átomo de oxigénio assinalado a azul na figura 7) e dois grupos doadores (o -NH e o -NH₂ indicados a laranja na figura 7). As pontes de hidrogénio que estes grupos podem estabelecer são essenciais para a ligação da guanina à sua base complementar, a citosina (como se pode verificar na figura 8) bem como para explicar as propriedades químicas mais relevantes desta base nitrogenada.

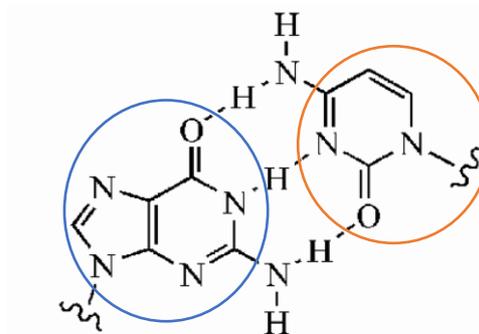


Figura 8 – Emparelhamento complementar das bases guanina/citosina (adaptada⁷⁵). A azul está representada a guanina e a laranja a citosina

As pontes de hidrogénio ilustradas na figura 8 são as mais comumente estabelecidas pela guanina, no entanto, esta é, de entre as bases nitrogenadas, a que apresenta uma estrutura mais complexa e com maior possibilidade de estabelecer este tipo de ligações⁷⁰. Em meio aquoso a guanina apresenta-se particularmente insolúvel, com tendência a agregar e a formar géis e soluções viscosas^{70,71}.

A guanosina, cuja estrutura se encontra representada na figura 6, é um nucleósido que resultará, formalmente, da reação entre a guanina e a ribose.

A associação do açúcar à base nitrogenada vai, necessariamente, alterar algumas das suas propriedades, nomeadamente ao nível da solubilidade. Os valores de solubilidade calculados com base em parâmetros teóricos estimam uma solubilidade inferior para a guanosina (0,7 mg/mL⁷⁶) quando comparada com a da guanina (2,31 mg/mL⁷⁷). No entanto, alguns autores apontam a guanosina como o composto mais solúvel de entre os dois, provavelmente devido aos dois grupos -OH fornecidos pelo derivado da ribose, que permitem a formação de pontes de hidrogénio com a água⁷¹.

Na comparação destas duas moléculas, importa, ainda, analisar os valores de pK_a de cada uma. A guanina apresenta quatro valores de pK_a, são eles -1,0, 3,3, 9,2 e 12,3, que correspondem, respetivamente, à transição da espécie dicatiónica para a espécie monocatiónica, à transformação desta na espécie neutra, à transformação da espécie neutra no anião, e, por fim, à transição deste para o dianião⁷¹. Já no caso da guanosina, a segunda e terceira transições ocorrem, respetivamente, na gama 2,1 a 2,2 e 9,2 a 9,5, não estando descritas as outras duas transições⁷⁰.

Conceptualmente, na formação dos ribonucleótidos, tanto a base nitrogenada como o grupo fosfato ligam-se ao açúcar, nas posições 1' e 5' respetivamente. Na figura 9 representa-se, esquematicamente, um ribonucleótido cuja base nitrogenada é a adenina. Ao substituir a adenina pelas restantes bases nitrogenadas a ligação entre os três elementos ocorrerá de forma análoga à apresentada, motivo pelo qual só se apresenta uma estrutura.

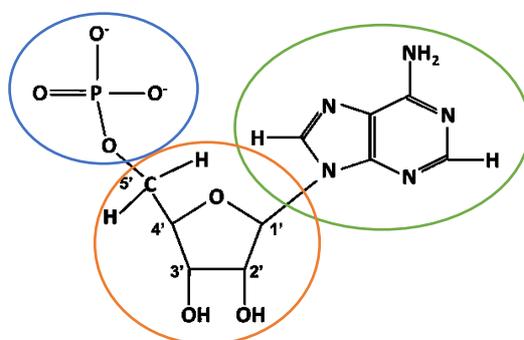


Figura 9 – Representação esquemática de um ribonucleótido (adaptada⁵⁹). A azul encontra-se representado o grupo fosfato, a laranja o açúcar e a verde a base nitrogenada (no caso, adenina)

No que diz respeito à síntese das bases nitrogenadas, as purinas podem ser obtidas graças à reação de polimerização do ácido cianídrico^{24,54,78,79,80}. Já no grupo das pirimidinas, destaca-se a obtenção de citosina a partir de reações entre o ciano-etino ou o ciano-acetaldeído e iões cianeto, cianogénio e ureia, e a formação de uracilo a partir de um processo hidrolítico que origina a desaminação oxidativa da citosina^{13,81,82}.

O cálcio, cuja importância em conjugação com a ribose já foi abordada, apresenta também características relevantes em conjugação com bases nitrogenadas (estando descritos casos em que está ligado à citosina⁸³) ou com nucleósidos (como a citidina, formalmente derivada da base nitrogenada referida⁸⁴) constituindo, assim, um meio para estudar o processo evolutivo de formação dos ribonucleótidos no mundo pré-biológico. É de sublinhar que o cálcio, ao ser usado nos nucleósidos, tende a ligar-se às posições 2' e 3' (consultar figura 6), protegendo-as⁸³. Desta forma a posição 5' poderá ficar disponível para reações de fosforilação.

1.2.1 Considerações gerais sobre iões

O cálcio é um elemento do segundo grupo da Tabela Periódica que forma, tendencialmente, iões dipositivos. Na forma catiónica poderá ter tido um papel fundamental na química pré-biológica, quer ao nível da estabilização da ribose na sua forma de ribofuranose, quer em utilização conjunta com bases nitrogenadas e nucleósidos, como a citosina e citidina, respetivamente. Na natureza tende a ocorrer na forma salina, em conjugação com aniões, que, no período pré-biótico eram, mais comumente, carbonatos, cloretos⁸⁵ e fosfatos⁵⁷. O sulfato, apesar de pouco abundante no éon Arcaico⁸⁵, começou a ser acumulado na hidrosfera no éon Proterozóico⁸⁶, motivo pelo qual foi estudado neste trabalho. Acrescente-se, ainda, a importância das suas especificidades químicas, nomeadamente o facto de, em solução, tomar a forma de um ião dinegativo derivado de um ácido forte, o ácido sulfúrico, constituindo assim um bom modelo para comparação com os aniões já referidos.

Dado que o cálcio poderá estabilizar moléculas pré-biológicas, será interessante aferir se algum dos aniões supracitados poderá degradá-las, à semelhança do que já está descrito para a ribose em presença de carbonato⁶¹. Importa, assim, analisar algumas características gerais destes aniões, bem como de catiões relacionáveis com o cálcio, como o magnésio e o lítio. O primeiro pertence ao mesmo grupo da Tabela Periódica que o cálcio, podendo, portanto, apresentar propriedades físicas e químicas similares, o que decorre do facto de possuir o mesmo número de eletrões de valência. Para além disso é, à semelhança do cálcio, muito importante para o metabolismo e muito abundante à superfície terrestre. Já o lítio, embora não seja essencial à vida, localiza-se na diagonal do magnésio (no primeiro grupo da Tabela Periódica), possuindo um tamanho comparável com este e podendo, portanto, apresentar propriedades similares. No entanto, na forma catiónica, o lítio apresenta-se como um moncatião ao passo que o magnésio toma a forma de um dicatião.

Os carbonatos, que em solução tomam a forma de aniões dinegativos derivados de um ácido fraco, o ácido carbônico, têm tendência a ligar-se a catiões metálicos (do primeiro e segundo grupos da Tabela Periódica) originando compostos tendencialmente pouco solúveis⁸⁷, como é o caso dos carbonatos de lítio, magnésio e cálcio⁸⁸. Os carbonatos de cálcio e magnésio, como calcite e dolomite, são encontrados na constituição dos condritos carbonáceos, sendo, portanto, pertinente o estudo da sua reatividade com moléculas pré-biológicas⁸⁹.

No caso dos sulfatos de cálcio e magnésio, a sua solubilidade varia consoante o nível de hidratação⁹⁰. O sulfato de cálcio di-hidratado caracteriza-se por ser termodinamicamente estável em soluções aquosas a temperaturas inferiores a 42 °C, apresentando tendência para cristalizar em soluções aquosas quando a baixas temperaturas⁹¹. No caso do sulfato de magnésio, para a preparação de soluções, é habitual optar por uma das suas duas formas hidratadas, a mono-hidratada ou a hepta-hidratada⁹².

O ião cloreto tende a ocorrer na natureza na forma de sal, que é, tipicamente, muito solúvel em meio aquoso^{93,94}. Esta solubilidade verifica-se tanto para o cloreto de cálcio, como para o cloreto de magnésio^{95,96}. Refira-se, ainda, que em solução o cloreto forma aniões mononegativos derivados de um ácido forte, o ácido clorídrico.

O fosfato apresenta tendência para formar sais, os quais são, tipicamente (com exceção dos obtidos com os metais alcalinos) pouco solúveis em água à temperatura ambiente⁹⁷. Quando em solução pode adquirir a forma trinegativa. Acrescente-se, ainda, que o fosfato, para além de ser um composto bastante relevante na constituição dos seres vivos, é usualmente utilizado como reagente pré-biológico, para a realização de reações de fosforilação, que estão descritas na literatura^{98,99}.

Capítulo 2: Objetivos do trabalho experimental

O presente trabalho experimental teve dois grandes objetivos.

Numa primeira instância avaliou-se a possibilidade de os ribonucleósidos se degradarem nas respectivas bases nitrogenadas, o que poderá fundamentar a síntese destes, não pela reação dos compostos nitrogenados com a ribose, mas antes a partir diretamente da pentose. Neste caso a formação decorrerá por passos, sendo a estrutura formalmente atribuída à base nitrogenada obtida imediatamente ligada ao açúcar. Na eventualidade deste pressuposto ser verificado poderia compreender-se a presença de bases nitrogenadas nos meteoritos como resultantes da degradação dos respectivos nucleósidos, quer por ação dos raios cósmicos¹⁰⁰ quer através de reações com alguns compostos químicos, nomeadamente os carbonatos. Na transformação do nucleósido na respetiva base nitrogenada o que se degradará será a ribose, caso não esteja protegida⁶¹.

A via mecanoquímica foi uma opção escolhida para a simulação de eventuais reações químicas decorrentes da energia libertada aquando do impacto meteorítico. Uma vez que se conheciam resultados preliminares¹⁰¹ em que a guanosina se decompôs em guanina, pelo uso desta via, foram efetuados estudos, em paralelo, de sistemas contendo ambos os compostos. O estudo em simultâneo revelou-se crucial pois a guanina, tal como visto no capítulo anterior, é, de entre as bases nitrogenadas, a que possui maior número de tautómeros. Desta forma, esperava-se, que a comparação de resultados facilitasse a sua interpretação. Os resultados referentes às amostras de guanina encontram-se sistematizados no capítulo 4, ao passo que os resultados referentes às amostras de guanosina são apresentados no capítulo 5.

Para além de estudadas pela via mecanoquímica, as amostras foram também estudadas em solução (ácida, básica e tendencialmente neutra). Ao nível dos iões, para ambas as vias, optou-se, principalmente, pelos carbonatos de cálcio e magnésio (tendo-se recorrido a alguns estudos com carbonato de lítio como complemento). Tanto o carbonato de cálcio, como o carbonato de magnésio, foram escolhidos devido à sua ocorrência nos condritos carbonáceos e, conseqüentemente, a sua muito provável importância pré-biológica. De entre os dois, o carbonato de magnésio constitui um modelo laboratorial mais eficaz na medida em que é mais solúvel, em meio aquoso, que o carbonato de cálcio (a 25 °C os valores de solubilidade são, respetivamente 0,139 mg/mL¹⁰² e 0,013 mg/mL¹⁰³), o que permite acelerar o processo reacional. Estudou-se, ainda, a possibilidade de degradação de citidina e adenosina nas respetivas bases nitrogenadas. No primeiro caso, apesar de não terem sido detetadas amostras de citosina em meteoritos⁴⁵, o estudo revelou-se pertinente na medida em que a citosina é a base complementar da guanina. Já a adenosina foi estudada pois também a sua base nitrogenada, pertencente à classe das purinas, está presente nos condritos carbonáceos. Os resultados destes estudos encontram-se, igualmente, no capítulo 5.

O segundo objetivo, cujos resultados se apresentam no capítulo 6, passou por aferir a possibilidade de fosforilar, na posição 5', ribonucleósidos quando em presença de hidroxiapatite. Este mineral, para além de constituir um provável reagente pré-biológico, é composto, simultaneamente por cálcio e fosfato. O cálcio, tal como referido anteriormente, apresenta tendência para se ligar às posições 2' e 3' (consultar figura 6), protegendo-as, o que poderá favorecer a fosforilação na posição 5'. Desta forma, utilizou-se hidroxiapatite em sistemas contendo guanosina, adenosina e citidina. A utilização desta via pretendeu complementar outras vias de fosforilação de nucleósidos já conhecidas, em que há igualmente proteção dos grupos 2' e 3', recorrendo, no caso, ao ião borato⁵⁵.

Capítulo 3: Parte experimental

3.1 Materiais e Instrumentos

Todos os reagentes e solventes foram usados sem purificação adicional: HCl (Riedel-de-Haën 37% puriss p.a), H₂SO₄ (Fluka Riedel-de-Haën 95-97%), adenosina (Sigma-Aldrich ≥ 99%), D₂O (Euriso-top 99,9%), CaCO₃ (Carlo Erba 99,5%), CaCl₂.2H₂O (Merck p.a 99,5%), CaSO₄.2H₂O (MeB Pure precipitate), citidina (Sigma 99%), guanina (Sigma ≥ 99,9%), guanosina (Sigma ≥ 99,9%), Li₂CO₃ (Specialty Chemicals Division Morristown, New Jersey; 99%), MgCO₃ (Merck p.a), MgCl₂.6H₂O (Puro Erba 99%), MgSO₄.7H₂O (Carlo Tuba 99,5%), NaOH (EKA, ACS reagente) e KHCO₃ (Baker Analyzed reagent crystal), ureia (p.a Merck).

Foi necessário preparar Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Para tal adaptou-se o procedimento seguido por Paz *et al*¹⁰⁴, utilizando-se, neste caso, uma solução de 0,35 g de Ca(OH)₂ (Sigma-Aldrich ≥ 95%) em 400 mL de água à qual se juntou, sob agitação, 0,71 mL de H₃PO₄ (Sigma-Aldrich ≥ 85%) a 4 M. Filtrou-se e lavou-se com água o precipitado formado. Utilizou-se acetona para secar. Por fim caracterizou-se o produto recorrendo às técnicas de difração de raios X de pós (PXRD, da nomenclatura inglesa *Power X-Ray Diffraction*) e espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier Transform InfraRed* ou FTIR, na nomenclatura internacional). A primeira caracterização serviu para confirmar que a hidroxiapatite é amorfa, ao passo que a segunda teve por objetivo atribuir as bandas mais significativas do espectro de infravermelho. Assim, as bandas a 562,26 e 605,24 cm⁻¹ foram atribuídas à vibração assimétrica do grupo fosfato e a banda a 1040,54 cm⁻¹ foi atribuída à vibração simétrica do mesmo grupo, o que está de acordo com os valores da literatura¹⁰⁵ (a comparação encontra-se no anexo A).

As soluções foram preparadas usando água destilada.

Os espectros de refletância difusa (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform* ou DRIFT na nomenclatura internacional) foram obtidos a partir de um espectrofotômetro contendo um seletor *Specac*, entre os 400 e 4000 cm⁻¹, 4 cm⁻¹ de resolução. Nesta análise o que se obtém é um rácio entre o espectro de feixe simples da amostra (moída com brometo de potássio) e o espectro de feixe simples da referência. Como referência foi utilizado brometo de potássio. Fizeram-se 500 acumulações para cada um dos espectros.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (NMR, da nomenclatura inglesa *Nuclear Magnetic Resonance*) de prótio e de fósforo foram obtidos utilizando um espectrômetro 400 MHz *Advance III Bruker*, equipado com sonda BBO 5 mm à temperatura ambiente. As soluções foram preparadas com uma mistura de água destilada e água deuterada.

Algumas amostras (contendo guanina ou guanosina) preparadas por via mecanoquímica foram adicionalmente moídas com recurso ao moinho de bolas MM400 Retsch (usando uma velocidade

de 30 rotações por minuto), utilizando bolas de aço inoxidável com 7 mm de diâmetro. As amostras preparadas pela via mecanoquímica foram analisadas por PXRD utilizando-se, para tal, um difratômetro de pó *Bruker D8 Advance* com ânodo de cobre (Cu K α 1, $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) operado a 40 kV e 40 mA e equipado com um LYNXEYE-XE. Os dados foram recolhidos usando a geometria *Brag-Brentano*.

Aquando das solubilizações foi necessário centrifugar algumas amostras, para separar os precipitados da solução, para tal recorreu-se a uma centrífuga *P-selecta* centro 8, LusoLab.

Houve casos em que, para facilitar a solubilização, foi necessário recorrer à via sonoquímica, utilizando-se, para tal, o equipamento de ultrassom *Transsonic T460 Elma*.

Os cristais obtidos foram analisados por difração de cristal único, SCXRD (da nomenclatura inglesa *Single Crystal X-Ray Diffraction*). A preparação foi feita num *cryoloop* utilizando Fomblin®. A análise foi efetuada num difratômetro *Bruker D8QUEST* com radiação de grafite monocromada (Mo K α , $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) a 293 K (19,9 °C). O gerador de raios X foi operado a 50 kV e 30 mA. A recolha de dados foi monotorizada pelo programa APEX3¹⁰⁶. Os programas SAINT¹⁰⁷ e SADABS¹⁰⁸ foram utilizados para corrigir os dados para distribuição Lorentziana, polarização e efeitos de absorção. O programa SHELXT¹⁰⁹ foi utilizado para a solução de estrutura e o programa SHELXL-97¹¹⁰ foi aplicado para o refinamento de matriz por mínimos quadrados em F². Todos os programas estão incluídos no pacote WINGX-Version 2014.^{111,112}. Átomos que não de hidrogénio foram refinados anisotropicamente. Estes átomos foram refinados utilizando uma matriz completa de mínimos quadrados com parâmetros térmicos anisotrópicos. Todos os átomos de hidrogénio ligados a átomos de carbono foram inseridos nas posições ideais e refinados automaticamente.

3.2 Procedimento experimental

3.2.1 Degradação de ribonucleósidos nas respetivas bases nitrogenadas

A primeira parte do trabalho experimental passou por aferir a possibilidade de os ribonucleósidos se degradarem nas respetivas bases nitrogenadas como consequência da reação com catiões metálicos.

Utilizaram-se amostras de guanosina, guanina, adenosina e citidina com cálcio, magnésio e lítio, nas suas formas de carbonato, sulfato e cloreto (o ião lítio só foi utilizado na forma de carbonato). Estas amostras foram preparadas, numa primeira fase, por via mecanoquímica na ausência de solvente, usando diferentes proporções e tempos de moagem. Algumas das amostras preparadas foram sujeitas à ação do moinho de bolas (com bolas de 7 mm), para verificar se a redução de tamanho dos reagentes facilitaria a reação. Nas amostras sujeitas ao moinho de bolas testou-se ainda a possibilidade de o incremento no tempo de moagem resultar numa alteração significativa

do tamanho das partículas, desta forma utilizaram-se diferentes tempos de moagem entre os 15 e os 40 minutos.

As amostras foram analisadas por PXRD e os difratogramas obtidos foram comparados com os conhecidos para cada um dos reagentes, para conferir a ocorrência de reação.

Em seguida algumas amostras foram sujeitas a tentativas de solubilização em diferentes meios (ácido, básico e tendencialmente neutro), procedimento após o qual se estudou a possibilidade de cristalização dos produtos da reação. A produção de soluções teve como objetivo, não só cristalizar os produtos obtidos pela via mecanoquímica, mas também, aferir as vantagens inerentes ao uso do meio aquoso. Neste meio as moléculas encontram-se, tendencialmente, ionizadas, o que poderá facilitar a reação, permitindo que compostos que não reagiram por via mecanoquímica reajam neste meio.

A solubilização foi testada em diversas condições, com vista a compreender quais as mais adequadas. Numa primeira fase, em meio aquoso sem adição de ácido ou base (admite-se, portanto, neutro) recorreu-se a diferentes quantidades de amostra (entre 4 e 209 mg), volumes de água (entre 4 e 41 mL), diferentes temperaturas (entre 40 °C e 95 °C), à via sonoquímica (testou-se a sua utilização face à sua não utilização, bem como a influência do tempo nas amostras em que esta técnica foi aplicada, variando entre 10 e 20 minutos) e testou-se, ainda, o papel da agitação aquando do aquecimento. Foram preferidos arrefecimentos lentos, após o aquecimento. O arrefecimento rápido, devido ao choque térmico, conduz, habitualmente, à precipitação de sólidos amorfos. Já ao preferir um arrefecimento lento favorecer-se-ia a cristalização do sistema.

A solubilização em meio aquoso ácido foi conseguida com ácido clorídrico 0,32 M e aquecimento com agitação, tendo-se testado temperaturas de solubilização entre 25 °C e 55 °C. Pelo motivo acima descrito foram, mais uma vez, preferidos arrefecimentos lentos.

A solubilização em meio aquoso básico foi utilizada apenas para as amostras de guanina, pois esta base nitrogenada apresentou dificuldades de solubilização em meio tendencialmente neutro. Utilizou-se um total de 20 mg de guanina que se solubilizou em soluções de água com hidróxido de sódio (testaram-se concentrações entre 0,050 e 1,2 M), recorrendo a agitação com aquecimento (testaram-se temperaturas entre 40 °C e 50 °C). Só após a solubilização da guanina foi adicionado o sal contendo o catião pretendido para o estudo. Apesar das dificuldades de solubilização da guanina, testou-se, ainda, a possibilidade de solubilizar, em meio básico, algumas amostras preparadas pela via mecanoquímica. Neste caso a concentração de base variou entre 0,20 e 0,47 M e a temperatura usada no aquecimento foi sempre de 40 °C. Os aquecimentos foram acompanhados de agitação. À semelhança dos casos anteriores foram preferidos arrefecimentos lentos.

Finalmente, após a solubilização, testou-se a influência da radiação solar na cristalização. Para este estudo cada amostra foi, após a solubilização, dividida em duas frações iguais, uma das quais foi sujeita a evaporação sob radiação solar enquanto a fração restante, para efeitos comparativos, foi sujeita a evaporação na ausência de radiação, garantindo-se o isolamento da radiação com o envolvimento em papel de alumínio. Em algumas amostras testou-se, ainda, a influência do uso de uma temperatura inferior à temperatura ambiente aquando da cristalização (as amostras foram, portanto, colocadas no frigorífico a cerca de 4 °C) numa tentativa de obter cristais adequados ao estudo por difração de cristal único.

3.2.2 Reações de fosforilação

A segunda parte do trabalho experimental consistiu em estudar a possibilidade de fosforilar a posição 5' de alguns ribonucleósidos (guanosina, adenosina e citidina) fazendo-os reagir com sais de cálcio (no presente caso hidroxiapatite), conhecidos por protegerem, tendencialmente, as posições 2' e 3' (consultar figura 6).

Prepararam-se amostras de guanosina, adenosina e citidina com hidroxiapatite na proporção 2:1 (ribonucleósido: cálcio) por via mecanoquímica, bem como uma amostra "mista", contendo guanosina, adenosina e hidroxiapatite na proporção 2:2:1 (guanosina: adenosina: cálcio). Não foi possível solubilizar a amostra contendo citidina, por isso o seu estudo não foi prosseguido. De entre as restantes, o estudo foi efetuado, numa primeira fase, em 2,5 mL de água e numa fase posterior recorrendo a um volume de água entre 10 e 11 mL. A solubilização pareceu ter ocorrido neste segundo caso. As amostras foram colocadas em agitação com aquecimento a 90 °C. De seguida adicionou-se, a cada amostra, cerca de 16 mg de ureia (esta funcionará como ativador para o fosfato pois este não reage diretamente com o ribonucleósido¹¹³). Em seguida as amostras foram colocadas num banho de óleo entre 90 °C a 95 °C. No caso das amostras em 2,5 mL de água realizaram-se 8 ciclos e no caso das amostras no volume superior, 9 ciclos alternando a presença dos reagentes em solução aquosa (cerca de 8 horas) e em seco (cerca de 16 horas). Por fim as amostras foram analisadas por ³¹P NMR.

Capítulo 4: Estudos com guanina

4.1 Via mecanoquímica

O primeiro passo, no estudo dos sistemas contendo guanina, consistiu em preparar as amostras descritas na tabela 1 pela via mecanoquímica na ausência de solvente. Recorreu-se, em seguida, à análise por PXRD para aferir a ocorrência de reação. Para tal o difratograma de cada amostra foi comparado com o conhecido para cada reagente isolado.

Tabela 1 – Dados sobre as amostras de guanina preparadas por via mecanoquímica

Designação da amostra	Composição/Proporção	Tempo no moinho de bolas
Guan/Mg1	Guanina: MgCO ₃ /1:1	Moída apenas no almofariz
Guan/Mg2	Guanina: MgCO ₃ /2:1	Moída apenas no almofariz
Guan/Mg3	Guanina: MgCO ₃ /2:1	15 minutos
Guan/Mg4	Guanina: MgCO ₃ /2:1	40 minutos
Guan/Li1	Guanina: Li ₂ CO ₃ /2:1	Moída apenas no almofariz
Guan/Li2	Guanina: Li ₂ CO ₃ /2:1	40 minutos
Guan/Ca1	Guanina: CaCO ₃ /2:1	40 minutos
Guan/Ca2	Guanina: CaSO ₄ .2H ₂ O/2:1	20 minutos

Não se verificou a ocorrência de reação na amostra Guan/Mg1. Já na amostra Guan/Mg2, cujo difratograma se apresenta na figura 10 (onde estão, ainda, representados os difratogramas de cada um dos reagentes quando isolados), as setas com a cor laranja indicam diferenças nos padrões de difração relativamente aos reagentes, o que indicia a provável ocorrência de reação. Uma vez que ambos os reagentes aparentam estar representados no difratograma da amostra a reação teria sido, apenas, parcial.

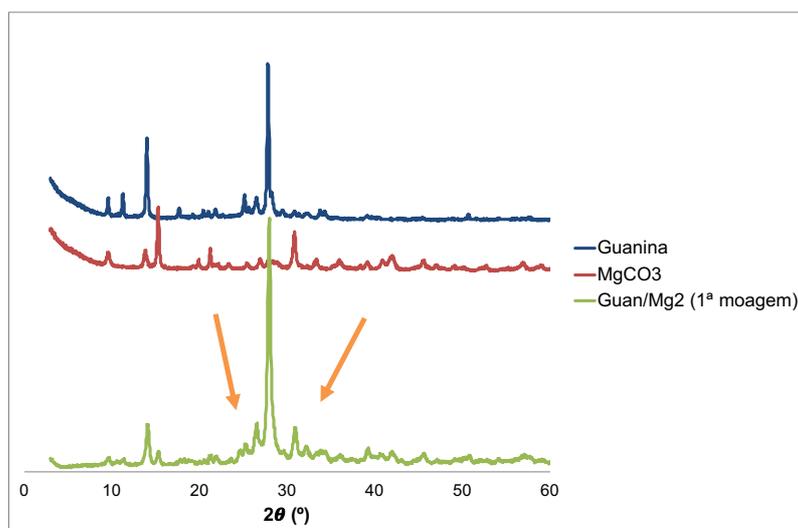


Figura 10 – Análise PXRD da primeira moagem da amostra Guan/Mg2 (a verde). Os difratogramas da guanina e do MgCO₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos

A evidência de reação na amostra Guan/Mg2 conduziu ao estudo do efeito do aumento do tempo de moagem. Para tal foram preparadas as amostras Guan/Mg3 e Guan/Mg4 na mesma proporção. Nestes dois novos casos recorreu-se ao moinho de bolas para aferir se o menor tamanho das partículas teria efeito no processo reacional. Assim as amostras foram sujeitas, respetivamente, a 15 e 40 minutos de moagem neste equipamento. No final verificou-se que nenhuma das amostras apresentava diferenças na coloração, face à coloração inicial, apresentando apenas uma granulação mais fina. Desta forma optou-se por analisar, por PXR, apenas a amostra Guan/Mg4, concluindo-se que esta se tinha tornado amorfa. O estado amorfo resultará, principalmente, do aumento da moagem sobre a guanina, o que se veio a confirmar nos resultados seguintes.

A amostra Guan/Li1 foi analisada por esta mesma técnica, neste caso, a seta a laranja na figura 11 denota uma ligeira deslocação do difratograma, sugerindo assim a ocorrência de reação, igualmente de forma parcial. Foram realizadas moagens posteriores, no almofariz, não se verificando qualquer alteração face à situação inicial. A amostra Guan/Li2, com a mesma composição e proporção que a amostra anterior, foi sujeita a moagem no moinho de bolas por um período de 40 minutos. Ao fim deste tempo a amostra apresentava uma granulação mais fina e uma tonalidade amarelada, o que poderia ter decorrido quer da sua decomposição, quer da formação de um tautómero diferente do inicial. Como foi visto no capítulo 1 a guanina é, de entre as bases nitrogenadas, a que possui um maior número de formas tautoméricas. O lítio, por ser um ião mais pequeno que o magnésio, poderá ter-se ligado a uma forma tautomérica diferente da obtida nas amostras Guan/Mg2, Guan/Mg3 e Guan/Mg4, dando origem à tonalidade observada. A análise PXR da amostra Guan/Li2 permitiu concluir que esta se tornou amorfa.

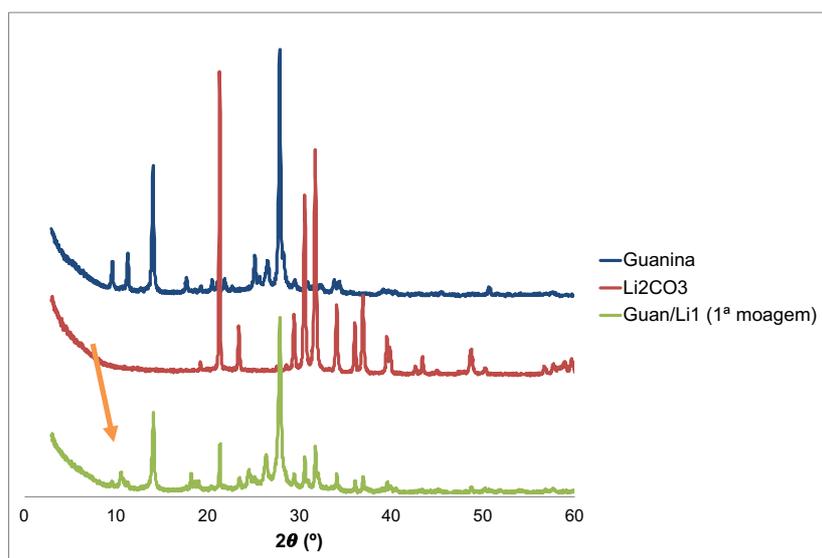


Figura 11 – Análise PXR da primeira moagem da amostra Guan/Li1 (a verde). Os difratogramas da guanina e do Li₂CO₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos

Finalmente, nas amostras com cálcio, Guan/Ca1 e Guan/Ca2, não foi possível verificar a ocorrência de reação. Em ambos os casos concluiu-se, após o uso do moinho de bolas durante, respetivamente, 40 e 20 minutos, que as amostras tendiam para o estado amorfo.

Em suma todas as amostras contendo guanina tendem para o estado amorfo quando sujeitas a moagem. Pode, assim, concluir-se que tal se deve à guanina e não à conjugação desta base nitrogenada com outros reagentes. No ponto 4.2 será avaliado o impacto deste estado na solubilização destas amostras em meio tendencialmente neutro. No ponto 5.1 será avaliada a resistência da guanosina à moagem, esta, por incluir um derivado de açúcar poderia resistir melhor à passagem ao estado amorfo.

4.2 Soluções aquosas sem adição de ácido ou base

Nesta secção do trabalho experimental testou-se a possibilidade de solubilizar, em meio tendencialmente neutro, algumas das amostras preparadas no ponto 4.1. Para além de se ter por objetivo estudar o comportamento das amostras em meio aquoso, ambicionou-se, também, cristalizar os produtos da reação e compreender os fatores em jogo no processo de cristalização. Desta forma, cada amostra foi dividida em duas frações iguais, uma foi colocada a evaporar sob radiação solar e a outra na ausência de radiação. A radiação solar, para além de acelerar o processo evaporativo, poderia também promover a reação.

A tabela 2 sumariza as condições experimentais utilizadas. Com exceção da amostra Guan/Mg5 todos os aquecimentos foram acompanhados de agitação.

Tabela 2 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanina em meio neutro

Designação da amostra	Composição/Proporção	Massa usada (mg)	Volume de água (mL)	Temperatura de aquecimento	Sonoquímica
Guan/Mg3	Guanina: MgCO ₃ /2:1	5,7	13	60 °C	10 minutos
Guan/Mg4	Guanina: MgCO ₃ /2:1	4,0	5,0	55 °C	20 minutos
Guan/Li2	Guanina: Li ₂ CO ₃ /2:1	2,9	8,0	50 °C	20 minutos
Guan/Ca1	Guanina: CaCO ₃ /2:1	3,2	8,0	50 °C	Não
Guan/Ca2	Guanina: CaSO ₄ .2H ₂ O/2:1	4,6	10	40 °C	Não
Guan/Mg5	Guanina: MgCO ₃ /2:1	4,6	15	60 °C	20 minutos
Guan/Li3	Guanina: Li ₂ CO ₃ /2:1	4,6	2,0	50 °C	Não
Guan/Ca3	Guanina: CaCO ₃ /2:1	4,2	22	60 °C	Não

A dificuldade em solubilizar guanina em meio aquoso foi descrita por *Darvishzad et al*¹, que a justificaram como devida à formação de nano partículas que se agregam formando partículas estáveis, dificultando, portanto, a solubilização total. Uma das soluções apresentadas para evitar

a formação destes agregados passa por usar pequenas quantidades de guanina em grandes volumes de água. Desta forma testou-se a possibilidade de solubilização das amostras Guan/Mg5, Guan/Li3 e Guan/Ca3 em meio aquoso, recorrendo, para tal, a quantidades não superiores a 5 mg, em diferentes volumes de água.

Com vista a aferir se o maior tempo de moagem facilitaria a solubilização, na medida em que se parte de partículas com uma granulação mais fina, testou-se a possibilidade de solubilizar as amostras que tinham sido sujeitas a moagem no moinho de bolas, Guan/Mg3, Guan/Mg4, Guan/Li2, Guan/Ca1 e Guan/Ca2. Destas, nenhuma foi solubilizada na totalidade, concluindo-se assim que o uso do moinho de bolas não apresenta vantagens para a solubilização em meio tendencialmente neutro pois conduz ao estado amorfo, que, segundo *Darvishzad et al*⁷¹ não favorece a solubilização. Quando a amostra se encontra no estado amorfo, a introdução de água na estrutura irá conduzir à formação dos agregados já descritos.

As amostras Guan/Ca1 e Guan/Ca3 foram as que estiveram mais próximas da solubilização total. Uma vez que as mesmas não foram sujeitas ao tratamento por sonoquímica conclui-se que este procedimento também não favorece a solubilização da guanina em meio tendencialmente neutro (o que vai de encontro ao verificado por *Darvishzad et al*⁷¹).

Finalmente, sublinhe-se que a amostra Guan/Mg5 foi produzida com vista a seguir a reação por ¹H NMR, e compará-la com a guanosina quando nas mesmas condições experimentais. No entanto, a dificuldade em solubilizar quantidade suficiente de amostra fez com que só se observasse o sinal da água deuterada. Desta forma só foi possível efetuar o estudo por ¹H NMR para a guanosina, como se descreverá no ponto **5.2**.

Perante a dificuldade em solubilizar guanina em meio tendencialmente neutro, foi aferida a possibilidade de a solubilizar em meio básico ou ácido (assunto a abordar nos pontos **4.3** e **4.4**, respetivamente). *Darvishzad et al*⁷¹ verificaram que, quando solubilizada em meio tendencialmente neutro, a guanina tende a baixar o pH do meio, tornando-o, portanto, mais ácido. Verificou-se que a solubilidade da guanina aumenta quer em meio ácido, quer em meio básico⁷¹, o que se deve ao facto de as moléculas estarem na forma iónica. Desta forma é possível fazer crescer cristais de guanina, que, de outra forma, seriam difíceis de obter, a não ser por recurso a solventes orgânicos polares apróticos¹¹⁴, que, na generalidade dos casos, não devem ter ocorrido em meio pré-biótico.

4.3 Soluções aquosas em meio básico

A dificuldade de solubilizar guanina em meio tendencialmente neutro, como visto ao longo da secção anterior, conduziu à decisão de solubilizar esta base nitrogenada em meio básico e meio ácido (assunto a abordar em detalhe na secção seguinte). O facto de a molécula de guanina se

apresentar ionizada nestes meios (protonada no meio ácido e desprotonada no meio básico) tenderia a facilitar a sua solubilização¹¹⁴.

Numa primeira fase testou-se a possibilidade de solubilizar primeiro a guanina e adicionar depois o outro reagente, pois a dificuldade de solubilização das amostras em meio neutro reside principalmente na dificuldade de solubilização da guanina. Assim, começou por se tentar solubilizar 20 mg de guanina em diferentes condições experimentais, que se encontram descritas na tabela 3, adicionando-se em seguida o reagente pretendido. Nestas amostras (com exceção da amostra Guan/Mg6 em que o aquecimento foi a 40 °C) utilizou-se aquecimento a 50 °C.

Tabela 3 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanina em meio básico

Designação da amostra	Composição/Proporção	[NaOH] (M)
Guan/Mg6	Guanina: MgSO ₄ .7H ₂ O/2:1	1,2
Guan1	Guanina	0,050
Guan/Ca4	Guanina: CaSO ₄ .2H ₂ O/2:1	1,0
Guan/Ca5	Guanina: CaSO ₄ .2H ₂ O/1:1	0,34
Guan/Ca6	Guanina: CaCl ₂ .2H ₂ O/2:1	0,052

A primeira amostra a solubilizar nestas condições, Guan/Mg6, foi solubilizada em condições severas (elevada concentração de hidróxido de sódio), verificando-se a rápida solubilização da guanina, à qual se adicionou, em seguida o sulfato de magnésio. A solução resultante foi colocada sob radiação solar, tendo originado, ao fim de alguns dias, um precipitado branco que foi lavado, para ficar seco, com água destilada e acetona. O mesmo foi, em seguida, analisado por DRIFT, não se verificando alterações no espectro quando comparado com o da guanina isolada, o que indicava não ter ocorrido qualquer transformação química.

Uma vez que a concentração de hidróxido de sódio na amostra Guan/Mg6 era muito elevada, testou-se a possibilidade de solubilizar guanina em meio básico utilizando condições mais suaves. Assim, na amostra Guan1 o objetivo foi solubilizar a guanina numa concentração de 0,050 M de hidróxido de sódio, o que não foi possível, logo nenhum reagente adicional foi colocado nesta amostra.

Na amostra Guan/Ca4 tentou-se replicar as condições experimentais da amostra Guan/Mg6 mas neste caso usando sulfato de cálcio em vez de sulfato de magnésio. Aqui a concentração de hidróxido de sódio usada foi ligeiramente inferior, no entanto não se considera a diferença relevante, apesar de não se ter conseguido obter uma solubilização completa. Algumas partículas permaneceram em suspensão originando um precipitado branco (após alguns dias sob radiação solar), o qual foi sujeito a lavagens com solventes similares aos utilizados para a amostra Guan/Mg6 e foi igualmente analisado por DRIFT. Neste caso o espectro da amostra apresentava algumas diferenças quando comparado com o da guanina, o que levou à comparação com o

espectro para o sulfato de cálcio¹¹⁵, verificando-se também aqui diferenças, como se pode comprovar pela observação da figura 12.

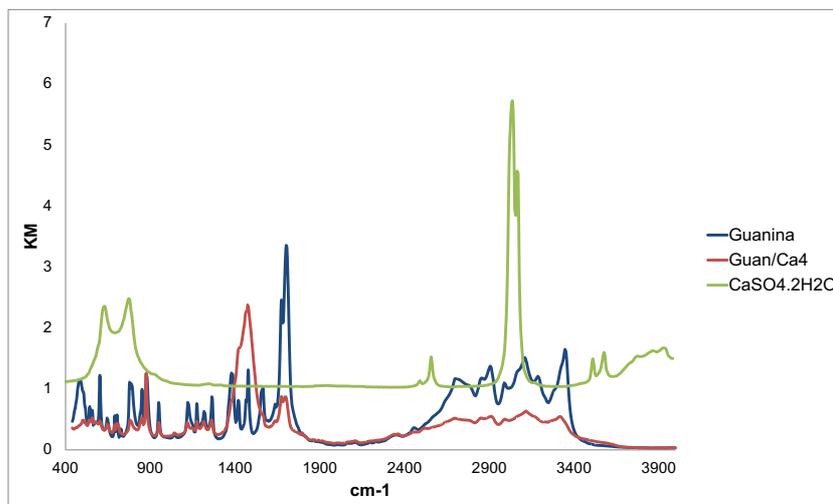


Figura 12 – Análise DRIFT da amostra Guan/Ca4 (a vermelho). Os espectros da guanina e do sulfato de cálcio apresentam-se a azul e verde, respetivamente, para efeitos comparativos.

Dadas as diferenças observadas fez-se a atribuição das bandas mais representativas do espectro de infravermelho para esta amostra, que se encontram detalhadas na tabela 4 (a numeração seguida é a apresentada na figura 6). O facto de existirem duas bandas às quais não foi possível fazer uma atribuição (consultou-se, ainda, as tabelas de infravermelho da Merck¹¹⁶, sem sucesso) indicia a ocorrência de reação. Em seguida tentou-se replicar as condições experimentais, mas neste caso na proporção 1:1 (amostra Guan/Ca5). No entanto, neste caso a solubilização foi mais difícil, obrigando a uma maior permanência da amostra sob aquecimento, o que favoreceu a evaporação. Desta forma foi necessário adicionar um volume de água superior, o que conduziu à diminuição da concentração de hidróxido de sódio. Durante o processo de solubilização a amostra apresentou partículas laranja, que podem resultar quer da coordenação da guanina com o cálcio quer da deslocalização das ligações π devido à formação de um tautómero de guanina diferente do inicial. Quando se conseguiu solubilizar colocou-se a evaporar sob radiação solar. Esteve sete dias a evaporar, tempo ao fim do qual se verificou que a solução apresentava um precipitado. Tentou solubilizar-se novamente o precipitado, sem sucesso, concluindo-se que o cálcio em excesso tem tendência a precipitar, podendo precipitar na forma de carbonato ou de hidróxido (a proporção a utilizar deve ser, portanto 2:1, guanina: cálcio), ainda assim, estudos posteriores são necessários para clarificar este pressuposto.

Tabela 4 – Atribuição das bandas mais representativas do espectro de IR da amostra Guan/Ca4¹¹⁷ (δ refere-se à flexão no plano e ν ao estiramento)

cm ⁻¹	Intensidade	Atribuição
690,40	fraca	δ (anel da pirimidina)
781,03	média/fraca	δ (N-1-H)
848,53	média/fraca	ν (C-C)
875,53	média	δ (N-9-H) fora do plano
950,74	média/fraca	δ (N-C=N) e δ (N-C-H)
1120,45	média/fraca	δ (C-N=C)
1174,44	média/fraca	δ (C-8-H) no plano
1214,94	média/fraca	ν (C-2-NH ₂)
1261,23	média/fraca	ν (C-5-N-7) e ν (C-4-N-9)
1475,29	forte	ν (N-7=C-8) e ν (C-8-N-9)
1673,92	média/fraca	ν (C=O)
1697,06	média/fraca	ν (C=O) e δ (NH ₂)
3118,35	média	Não identificada
3316,98	média	Não identificada

A amostra Guan/Ca6 sofreu uma tentativa de solubilização, numa primeira fase, com 0,052 M de NaOH a 50 °C. Uma vez que não solubilizou, a amostra foi sujeita a aquecimento com refluxo (com a adição prévia de 6 mL de água) durante 28 horas (durante este período mais 6 mL de água foram adicionados). Verificou-se a formação de precipitado o que permitiu concluir que a amostra reage a quente. Adicionou-se mais NaOH mas não foi possível obter uma solubilização total (18 mL NaOH 0,2 M), por isso separou-se a solução do precipitado. A solução foi, por seu turno, separada em duas, uma colocada a evaporar sob radiação solar e outra na ausência de radiação. No caso da solução sob radiação solar, verificou-se ao fim de 20 dias, a presença de duas partículas vermelhas precipitadas e uma em suspensão. Estas partículas, à semelhança das partículas laranja já descritas, podem resultar quer da coordenação da guanina com o cálcio quer da formação de um tautómero de guanina diferente do inicial, ainda assim, estudos posteriores são necessários para aferir as condições de formação destas partículas. Já no caso da amostra a evaporar na ausência de radiação solar, a caracterização do precipitado obtido não foi possível e, portanto, o seu estudo não foi prosseguido.

Em seguida testou-se a possibilidade de solubilizar, em meio básico, amostras contendo guanina preparadas por via mecanoquímica. Aqui o objetivo foi aferir se o tamanho mais reduzido das partículas seria vantajoso aquando da solubilização. À semelhança do passo anterior utilizaram-se diferentes massas de amostra e concentrações de base. As informações encontram-se sintetizadas na tabela 5.

Tabela 5 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanina (preparadas por via mecanoquímica) em meio básico

Designação da amostra	Massa amostra (mg)	[NaOH] (M)
Guan/Ca1.1	17,2	0,47
Guan/Ca1.2	6,8	0,20
Guan/Ca2	4,6	0,20

A amostra Guan/Ca1 (consultar tabela 1) sofreu duas tentativas de solubilização, na primeira (Guan/Ca1.1) a solubilização foi conseguida com uma concentração de hidróxido de sódio de 0,30 M para uma massa de amostra de 17,2 mg. Sendo a amostra, em seguida, dividida em três partes iguais, uma foi colocada a evaporar sob radiação solar, outra na ausência de radiação e a terceira foi colocada a uma temperatura inferior à temperatura ambiente, no frigorífico a cerca de 4 °C, para favorecer a formação de cristais. No entanto, ao fim de três dias, a amostra sob radiação solar apresentava um precipitado branco, que se tentou solubilizar novamente, adicionando, para tal, mais hidróxido de sódio. A concentração final de base foi de 0,47 M e a solubilização total não foi possível. O estudo das restantes amostras (amostra na ausência de radiação e amostra no frigorífico) não foi prosseguido. Já para a amostra Guan/Ca1.2 a solubilização foi possível para uma massa de 6,8 mg de amostra com uma concentração de hidróxido de sódio de 0,20 M, concluindo-se assim que o uso de menores quantidades de amostra facilita a solubilização. Esta amostra foi colocada a evaporar sob radiação solar durante nove dias, tempo ao fim do qual apresentava um precipitado de cor mostarda. Não foi possível caracterizar a estrutura obtida, por isso estudos posteriores serão necessários.

Para solubilizar a amostra Guan/Ca2 utilizou-se uma massa de 4,6 mg de amostra e uma concentração de hidróxido de sódio de 0,20 M, verificando-se, mais uma vez, que a utilização de menor quantidade de amostra facilita a solubilização. A amostra foi, em seguida, dividida em três, uma foi colocada a evaporar sob radiação solar, outra na ausência de radiação e a terceira foi colocada numa temperatura inferior à temperatura ambiente, no frigorífico a cerca de 4 °C, para favorecer a formação de cristais. A amostra sob radiação solar apresentava, ao fim de seis dias, um precipitado branco com partículas pretas, que sofreu nova tentativa de solubilização. Aqui a solubilização foi possível utilizando apenas água, tendo-se utilizado 17 mL. Não foi possível caracterizar os precipitados de nenhuma das amostras, sendo, portanto, necessários estudos posteriores.

Neste ponto do trabalho laboratorial concluiu-se, à semelhança do que tinha sido proposto por *Darvishazd et al*⁷¹, que a guanina solubiliza mais facilmente em meio básico do que em meio tendencialmente neutro. Tal deve-se, principalmente, ao facto de esta base nitrogenada se apresentar na forma iónica, estabelecendo, assim, mais facilmente, pontes de hidrogénio com o meio aquoso. Na figura 13 apresentam-se as duas formas iónicas mais comuns em meio básico. Os átomos de nitrogénio assinalados a azul podem receber hidrogeniões, estabelecendo, assim pontes de hidrogénio com o meio aquoso, o que facilita a solubilização.

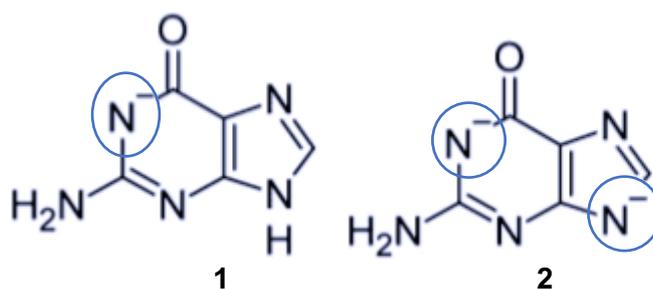


Figura 13 – Tautómeros mais comuns da guanina em meio básico. **1** – para a espécie monoaniônica; **2** – para a espécie dianiônica (adaptada⁷¹)

Os valores de pK_a estimados para estas espécies são, 9,2 e 12,3 e correspondem, respectivamente, à transição da espécie neutra para a espécie monoaniônica e à transição da espécie monoaniônica para a espécie dianiônica⁷¹.

Após a solubilização da guanina, que era, como visto na secção **4.2**, o ponto mais difícil desta fase, foi possível adicionar o reagente pretendido. No caso das amostras obtidas em condições severas (Guan/Mg6 e Guan/Ca4) verificou-se a formação de precipitados brancos que resultaram, possivelmente, da coordenação dos íons em solução com a espécie dianiônica da guanina. No caso da amostra Guan/Mg6 não foi possível verificar a ocorrência de reação, o que se pode dever a uma baixa afinidade da guanina para com o sulfato de magnésio, ou ainda, a uma ligação preferencial do magnésio ao -OH do meio. No entanto, o facto de não se ter estudado a relação da guanina com o sulfato de magnésio por via mecanoquímica não permite retirar conclusões definitivas, sendo necessários estudos posteriores. Já no caso da amostra Guan/Ca4 verificou-se, por recurso a DRIFT, a ocorrência de reação, indiciando a melhor afinidade do sulfato de cálcio, comparativamente ao sulfato de magnésio, para reagir com a guanina. Para a ocorrência de reação a ligação do catião cálcio ao -OH do meio terá sido preterida a favor da ligação deste à guanina. Destaque-se, aqui, que a amostra Guan/Ca2 (produzida por via mecanoquímica e analisada por PXRD) não tinha apresentado reação. Desta forma foi possível concluir que a utilização do meio básico é favorável à ocorrência de reação entre a guanina e o sulfato de cálcio. A amostra Guan/Ca5, com a mesma composição de Guan/Ca4, mas proporção guanina: cálcio 1:1 não evidenciou a ocorrência de reação. Tal pode dever-se à alteração da proporção ou à alteração da concentração de hidróxido de sódio utilizada, o que não permite relacionar inequivocamente as duas situações.

A existência de partículas vermelhas e de um precipitado de cor mostarda nas amostras Guan/Ca6 e Guan/Ca1.2, respetivamente, indicia que a concentrações inferiores de NaOH a espécie tautomérica apresentada em 2 (na figura 13) ligar-se-á ao cálcio originando um composto colorido. No caso da amostra Guan/Ca1.2 esta coloração revela-se particularmente importante pois esta

amostra não tinha evidenciado reação em estado sólido, comprovando-se, mais uma vez, a importância do meio aquoso (neste caso básico) para a reação.

Em suma, foi possível solubilizar amostras contendo guanina em meio básico quer em condições severas, quer em condições suaves. Em condições severas foi possível solubilizar massas superiores às utilizadas em condições suaves. No entanto, a possibilidade de a guanina apresentar duas formas iónicas (presentes na figura 13) em meio básico, aliada ao facto de não ter sido possível obter as estruturas dos produtos de reação fez com que não fosse viável utilizar estes resultados para comparar com amostras de guanosina no mesmo meio.

4.4 Soluções aquosas em meio ácido

À semelhança do que acontece em meio básico, é expectável que a guanina solubilize mais facilmente em meio ácido, por se encontrar na forma iónica. Neste caso a guanina apresenta também duas formas iónicas, cujas formas tautoméricas mais comuns se apresentam na figura 14⁷¹. Os nitrogénios assinalados a azul estão disponíveis para receber hidrogénios. Como estes são distintos dos sinalizados na figura 13 é expectável que as estruturas obtidas em meio ácido sejam diferentes das obtidas em meio básico.

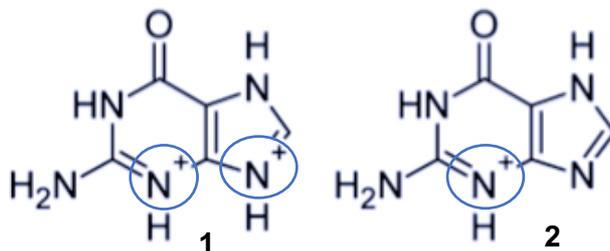


Figura 14 – Tautómeros mais comuns da guanina em meio ácido. **1** – para a espécie dicatiónica; **2** – para a espécie monocatiónica (adaptada⁷¹)

Os valores de pK_a , neste caso são, respetivamente, -1,0 e 3,3, para a transição da espécie dicatiónica para monocatiónica e para a transição da espécie monocatiónica para a espécie neutra⁷¹.

Na solubilização da guanina em meio ácido recorreu-se a ácido clorídrico e a ácido sulfúrico. A tabela 6 sintetiza os dados referentes às amostras solubilizadas utilizando ácido clorídrico. Todas as amostras foram aquecidas a 50 °C, com exceção da amostra Guan/Ca7, aquecida a 55 °C, e Guan/Ca9, aquecida a 40 °C.

Tabela 6 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanina em meio ácido (utilizando HCl)

Designação da amostra	Composição/Proporção	[HCl] (M)
Guan/Mg7	Guanina: MgSO ₄ .7H ₂ O/2:1	0,33
Guan/Mg8	Guanina: MgCl ₂ .6H ₂ O/2:1	0,32
Guan/Ca7	Guanina: CaSO ₄ .2H ₂ O/2:1	0,32
Guan/Ca8	Guanina: CaCl ₂ .2H ₂ O/2:1	0,32
Guan/Ca9	Guanina: CaCO ₃ /2:1	0,32

Na solubilização das amostras Guan/Mg7 e Guan/Mg8 optou-se por solubilizar primeiro a guanina e só depois adicionar o sulfato e cloreto de magnésio, respectivamente, verificando-se, em ambas, solubilização total. As amostras foram colocadas a evaporar sob radiação solar, tendo-se obtido, ao fim de poucos dias, precipitados brancos que não apresentavam características visuais relevantes, não se tendo prosseguido o estudo das referidas amostras.

Já para as amostras de guanina contendo o catião cálcio, Guan/Ca7, Guan/Ca8 e Guan/Ca9, a solubilização foi, nos dois primeiros casos, mais difícil, tendo-se obtido uma solução transparente com partículas em suspensão. Nestes casos (Guan/Ca7 e Guan/Ca8) optou-se por solubilizar primeiro a guanina e só depois adicionar o sal de cálcio. Já no caso da amostra Guan/Ca9, previamente processada pela via mecanoquímica com recurso ao moinho de bolas (utilizou-se, aqui, uma parte da amostra Guan/Ca1), verificou-se solubilização total. Após a solubilização, a amostra Guan/Ca9 foi separada em três partes iguais, uma destas foi colocada a evaporar sob radiação solar, uma outra foi colocada a evaporar na ausência de radiação e a última foi colocada numa temperatura inferior à temperatura ambiente, no frigorífico a cerca de 4 °C, com vista a favorecer a formação de cristais, não se tendo obtido, em nenhum dos casos, resultados que merecessem o prosseguimento do estudo.

Uma vez que o ião magnésio, na sua forma de sulfato e carbonato, é mais solúvel que o ião cálcio quando presente nos mesmos sais, o seu uso nestas condições experimentais revelou-se vantajoso. No entanto, em nenhum dos casos se obteve resultados que indicassem a formação de complexos com qualquer um dos sais. Com o objetivo de verificar se a ausência de resultados se relacionava com o ácido escolhido preparou-se uma última amostra utilizando ácido sulfúrico em vez de clorídrico (Guan/Mg9).

Na preparação da amostra Guan/Mg9 começou por se solubilizar a guanina em meio ácido ([H₂SO₄] = 0,55 M) recorrendo a aquecimento (T = 45 °C) com agitação. Só após a solubilização da guanina se adicionou sulfato de magnésio hepta-hidratado na proporção 2:1 (guanina: magnésio). Ao fim de um dia a amostra apresentava um precipitado que foi solubilizado com recurso a 4 mL de água e agitação com aquecimento a 40 °C. A amostra foi, finalmente, dividida em três frações iguais, uma destas foi colocada a evaporar sob radiação solar, uma outra foi colocada a evaporar na ausência de radiação e a última foi colocada numa temperatura inferior à temperatura ambiente, no frigorífico a cerca de 4 °C. Destas três amostras apenas a que não esteve sob radiação solar originou um precipitado cristalino, que se concluiu ser sulfato de guanina hemi-hidratada e cuja

estrutura está presente na figura 15. Esta estrutura não é mencionada na *CambridgeDataBase*¹¹⁸, sendo, portanto, uma novidade.

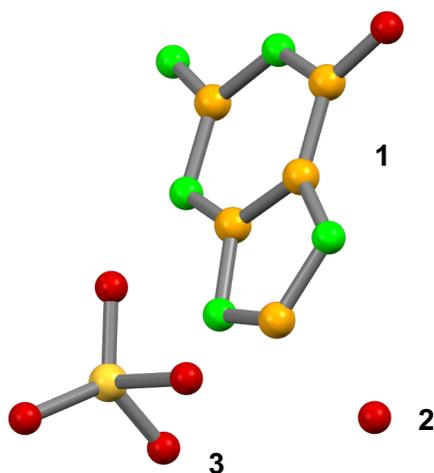


Figura 15 – Estrutura do sulfato de guanina hemi-hidratada. **1** - Estrutura da guanina, a verde apresentam-se os átomos de nitrogénio, a amarelo os de carbono e a vermelho o de oxigénio; **2** - Molécula de água partilhada com outro sulfato de guanina hemi-hidratada da mesma célula unitária; **3** - Estrutura do sulfato, a vermelho apresentam-se os átomos de oxigénio e a amarelo o átomo de enxofre. Os átomos de hidrogénio foram, em todos os casos, omitidos para facilitar a compreensão

A tabela 7 apresenta os dados do cristal, bem como os valores usados para o refinamento da sua estrutura. As expressões (1) e (2) indicam como foram calculados, respetivamente R_1 e wR_2 .

$$R_1 = \frac{\sum ||F_0| - |F_c||}{\sum |F_0|} \quad (1)$$

$$wR_2 = \frac{\sum [w(F_0^2 - F_c^2)]^{1/2}}{\sum [w(F_0^2)]} \quad (2)$$

Na tabela 7 (tal como na 8), Z é o número de unidades assimétricas que se relacionam por simetria na célula unitária; μ é o coeficiente de absorção linear; R_{int} permite relacionar as intensidades simples e compostas com as calculadas através da refinação e GOF indica o nível de adequação do modelo à observação.

Tabela 7 – Dados do cristal de sulfato de guanina hemi-hidratada e valores utilizados para o seu refinamento

Fórmula	C ₂₀ H ₂₀ N ₂₀ O ₂₂ S ₄
Massa Molecular (g/mol)	1020,8
Forma do cristal, cor	Bloco, sem cor
Tamanho do cristal (mm)	0,14 x 0,05 x 0,03
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	<i>P</i> -1
a (Å)	6,434(5)
b (Å)	10,477(6)
c (Å)	13,357(7)
α (°)	77,13(3)
β (°)	86,02(4)
γ (°)	81,82(4)
Z	1
Volume (Å³)	868,1(9)
Temperatura (K)	293
Densidade (g/cm³)	1,953
μ (Mo K α) (mm⁻¹)	0,401
Gama de ângulos, θ (°)	2,267 – 24,999
Refletância colhida	26558
Refletância independente	3073
R_{int}	0,2125
R₁; wR₂ [I ≥ 2σ(I)]	0,1473; 0,4046
GOF em F²	1,598

Esta estrutura foi conseguida após alguns dias de evaporação da solução correspondente na ausência de radiação solar. Desta forma é possível concluir que a radiação solar não tem um papel ativo no processo reacional. Uma vez que a estrutura foi obtida em meio ácido pode concluir-se que este é fundamental, não só para a obtenção do cristal, mas também para a solubilização completa da guanina. Neste caso o meio ácido usado não estava muito concentrado (0,55 M), logo a forma iónica de guanina em solução seria, provavelmente, a 2 da figura 14. O uso de um ácido mais forte, ou do mesmo ácido numa concentração superior, poderá obrigar à protonação de mais um átomo de nitrogénio, permitindo a obtenção da forma iónica número 1 da figura 14, podendo originar uma estrutura diferente.

Pela análise dos dados da tabela 7 pode concluir-se que a estrutura é composta por quatro moléculas de sulfato de guanina coordenadas com duas moléculas de água. A guanina, em meio ácido, pode originar guanina hidrociorada mono¹¹⁹ ou di-hidratada¹²⁰. Uma vez que a presente estrutura foi igualmente obtida em meio ácido, alguns dos valores presentes na tabela 7 foram

comparados com os conhecidos para as estruturas hidrocloradas. No caso da guanina hidroclorada mono-hidratada (cujo estudo está igualmente descrito a 293 K) a célula unitária é monoclinica¹¹⁹, ao passo que no presente caso é triclinica, o que significa que em ambos os casos os valores de a, b e c são diferentes, mas na guanina hidroclorada mono-hidratada dois dos ângulos (α e γ) são iguais a 90 ° enquanto que na presente estrutura todos os ângulos são diferentes de 90 °. Na guanina hidroclorada mono-hidratada, tanto a como b são inferiores aos obtidos neste caso¹¹⁹, sendo c superior. Os valores são, respetivamente, 4,497(1), 9,995(1) e 19,304(2) Å, ao passo que no presente caso são, respetivamente, 6,434(5), 10,477(6) e 13,357(7) Å. β é, para a guanina hidroclorada mono-hidratada, 107,90(1) °, ao passo que para a estrutura obtida toma o valor de 86,02(4) °. Também Z é inferior no presente caso (tem valor unitário) quando comparado com Z da guanina hidroclorada mono-hidratada (toma o valor 4). Ainda na comparação destas duas estruturas, importa referir que, apesar de pertencerem a grupos espaciais distintos ($P2_1/c$ no caso da guanina hidroclorada mono-hidratada e P-1 no presente caso), a rede de Bravais é, em ambos os casos constituída por uma célula unitária simples que se caracteriza por apresentar os pontos reticulares nos vértices do paralelepípedo que a constitui¹²¹. Já na comparação da guanina hidroclorada di-hidratada com o sulfato de guanina obtido no presente trabalho importa referir que tanto a como b tomam valores superiores, ao passo que c toma um valor inferior, respetivamente, $14,69 \pm 0,01$, $13,40 \pm 0,01$ e $4,840 \pm 0,005$ Å¹²⁰. β é, para a guanina hidroclorada di-hidratada ($93,8 \pm 0,1$ °) superior ao obtido para o sulfato de guanina. Finalmente, verifica-se, mais uma vez que o grupo espacial é distinto ($P2_1/\alpha$) mas apresenta o mesmo tipo de rede de Bravais que o apresentado pelo sulfato de guanina hemi-hidratada. Estas diferenças resultam, certamente, da diferença de dimensões entre os iões sulfato e cloreto. O primeiro, por ser constituído por mais átomos, (um átomo de enxofre e quatro de oxigénio) apresenta uma dimensão superior ao segundo, que é constituído apenas pelo anião cloreto.

Finalmente comparou-se as distâncias interatómicas da estrutura obtida com a guanina hidroclorada di-hidratada¹²⁰ e com a guanina anidra¹²². Nesta comparação a diferença mais notória reside nas ligações N1-C2 e C2-N3 (consultar numeração da figura 6). A primeira ligação toma o valor de 1,374 Å para a guanina hidroclorada di-hidratada, 1,372 Å para a guanina anidra e 1,332 Å para o sulfato de guanina hemi-hidratada. A redução significativa do comprimento de ligação na estrutura do sulfato de guanina hemi-hidratada, quando comparado com as outras duas estruturas, indicia que a ligação N1-C2 terá, nesta estrutura, um carácter mais próximo da ligação dupla do que da ligação simples. Tal poderá resultar da protonação do átomo de nitrogénio 3, o que é fundamentado pelo aumento do comprimento da ligação C2-N3 na estrutura obtida (1,348 Å) quando comparado com o comprimento da mesma ligação quer na estrutura hidroclorada di-hidratada (1,318 Å) quer na estrutura anidra (1,33 Å). O contra-íão da estrutura obtida neste trabalho deve ser, provavelmente, o ião sulfato, no entanto estudos posteriores recorrendo a cálculos teóricos serão necessários para clarificar esta suposição.

Capítulo 5: Degradação de ribonucleósidos nas respectivas bases nitrogenadas

5.1 Via mecanoquímica

O conhecimento da capacidade da guanosina se degradar em guanina por ação da radiação cósmica¹⁰⁰ aliado aos resultados preliminares obtidos por *Carvalho et al*¹⁰¹, em que a guanosina, em conjugação com o carbonato de magnésio, por ação mecanoquímica, se degradou num derivado da guanina, cuja estrutura se apresenta na figura 16, foram as linhas condutoras desta secção do trabalho.

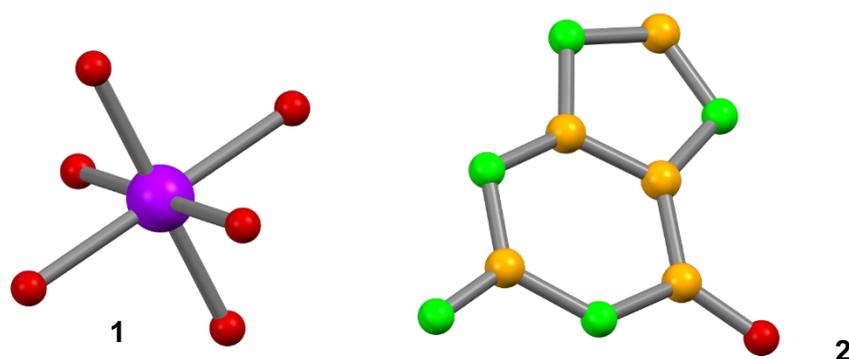


Figura 16 – Estrutura obtida após a reação de guanosina com carbonato de magnésio. **1** – Ião magnésio (a roxo) coordenado a seis moléculas de água; **2** – Estrutura formalmente derivada da guanina onde os átomos de nitrogénio estão representados a verde, os de carbono a amarelo e o de oxigénio a vermelho. Os átomos de hidrogénio foram omitidos para facilitar a compreensão

A má qualidade dos cristais (cuja estrutura se apresenta na figura 16) impediu a determinação da localização da carga da guanina. Desta forma, no presente trabalho, estudou-se a possibilidade de decompor a guanosina em guanina noutras condições experimentais.

A tabela 8 apresenta os dados do cristal, bem como os valores usados para o refinamento da estrutura. R_1 e wR_2 foram calculados recorrendo, mais uma vez, às expressões (1) e (2).

Tabela 8 – Dados do cristal cuja estrutura se apresenta na figura 16, e valores utilizados para o seu refinamento

Fórmula	C ₁₀ H ₄ MgN ₁₀ O ₈
Massa Molecular (g/mol)	416,54
Forma do cristal, cor	Placa, esverdeado
Tamanho do cristal (mm)	0,18 x 0,10 x 0,03
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	<i>P</i> -1
a (Å)	6,9346(7)
b (Å)	7,2783(5)
c (Å)	9,4942(8)
α (°)	99,951(4)
β (°)	106,329(5)
γ (°)	107,389(5)
Z	1
Volume (Å³)	421,236
Temperatura (K)	293
Densidade (g/cm³)	1,642
μ (Mo K α) (mm⁻¹)	0,175
Gama de ângulos, θ (°)	2,329 – 28,024
Refletância colhida	11069
Refletância independente	1785
R_{int}	0,4751
R₁; wR₂ [I ≥ 2σ(I)]	0,1182; 0,2478
GOF em F²	1,091

Foram preparadas amostras de guanosina com carbonato de magnésio com vista a aferir as condições necessárias para obter o composto da figura 16. Em simultâneo testou-se a possibilidade de degradação da guanosina com recurso a outros iões, bem como a possibilidade de degradação de outros ribonucleósidos (no caso, adenosina e citidina) nas respetivas bases nitrogenadas. A tabela 9 sintetiza as amostras preparadas neste ponto, as quais foram preparadas por via mecanoquímica e em seguida analisadas por PXRD, à semelhança do que tinha sido feito para as amostras de guanina.

Tabela 9 – Dados sobre as amostras preparadas por via mecanoquímica

Designação da amostra	Composição/Proporção
Gs/Mg1	Guanosina: MgCO ₃ /1:1
Gs/Mg2	Guanosina: MgCO ₃ /2:1
Gs/Mg3	Guanosina: MgCO ₃ /2:1
Gs/Mg4	Guanosina: MgSO ₄ .7H ₂ O/1:1
Gs/Li1	Guanosina: Li ₂ CO ₃ /2:1
Gs/Ca1	Guanosina: CaCO ₃ /2:1
Ade/Mg1	Adenina: MgCO ₃ /1:1
Ads/Mg1	Adenosina: MgCO ₃ /1:1
Ads/Mg2	Adenosina: MgCO ₃ /2:1
Cit/Mg1	Citidina: MgCO ₃ /2:1

Das amostras presentes na tabela 9, apenas a amostra Gs/Mg3 foi sujeita a moagem no moinho de bolas, durante um período de 20 minutos.

A análise PXRD da amostra Gs/Mg1 não evidenciou a ocorrência de reação, já no caso da amostra Gs/Mg2 verificou-se a ocorrência de reação (como se pode comprovar pela figura 17, onde o difratograma da amostra aparece deslocado face ao difratograma conhecido para a guanosina), concluindo-se assim que a existência de metade da quantidade química de carbonato de magnésio em relação à guanosina é mais adequada do ponto de vista reacional.

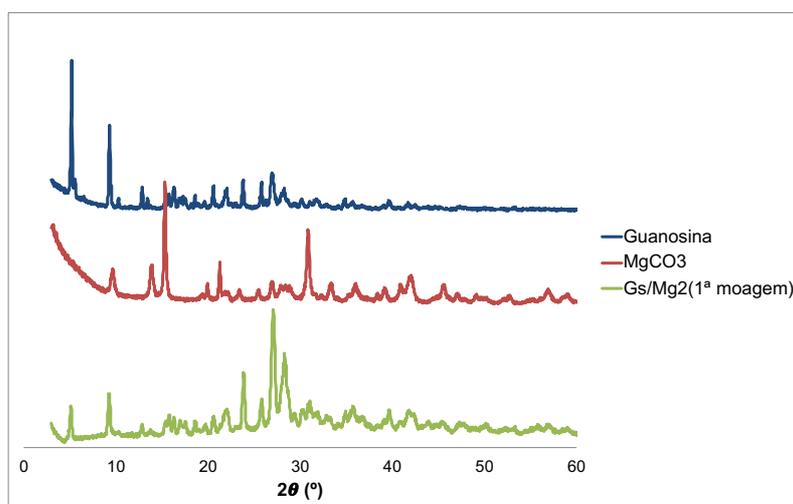


Figura 17 – Análise PXRD da primeira moagem da amostra Gs/Mg2 (a verde). Os difratogramas da guanosina e do MgCO₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos

Uma vez que a amostra Gs/Mg2 reagiu, preparou-se a amostra Gs/Mg3 com a mesma composição e proporção, para aferir se, neste caso, o uso do moinho de bolas seria vantajoso para o processo reacional. Assim, a amostra Gs/Mg3 foi sujeita, durante 20 minutos, a moagem neste equipamento, tempo após o qual se verificou apresentar a mesma tonalidade que a amostra Gs/Mg2, mas uma granulação mais fina. A análise PXRD da amostra Gs/Mg3 evidenciou que esta não ficou completamente amorfa (como se pode observar na figura 18), concluindo-se assim que

a guanósina não apresenta tanta facilidade como a guanina para atingir o estado amorfo, após processamento no moinho de bolas, o que se poderá dever à presença do derivado do açúcar nesta estrutura.

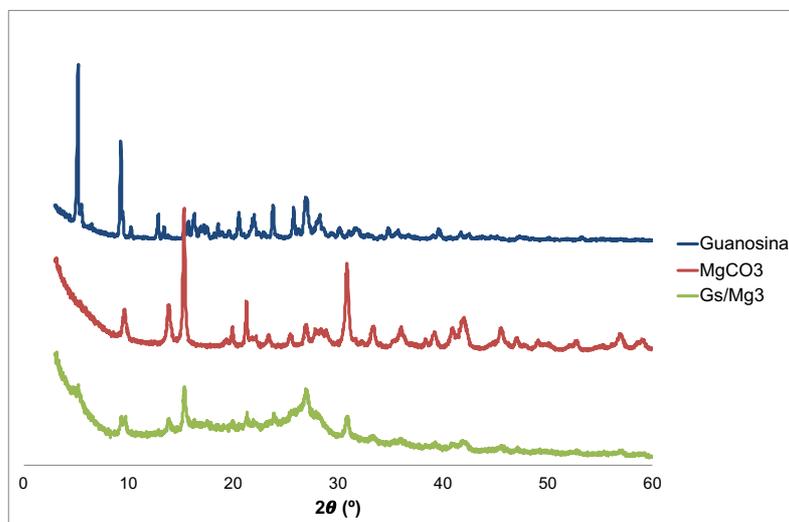


Figura 18 – Análise PXRD da amostra Gs/Mg3 (a verde) após 20 minutos no moinho de bolas. Os difratogramas da guanósina e do MgCO₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos

Não se verificou reação para as amostras Gs/Mg4 e Gs/Li1, motivo pelo qual não se apresentam os respetivos difratogramas. Verificou-se reação para a amostra Gs/Ca1, como se pode comprovar pela observação da figura 19.

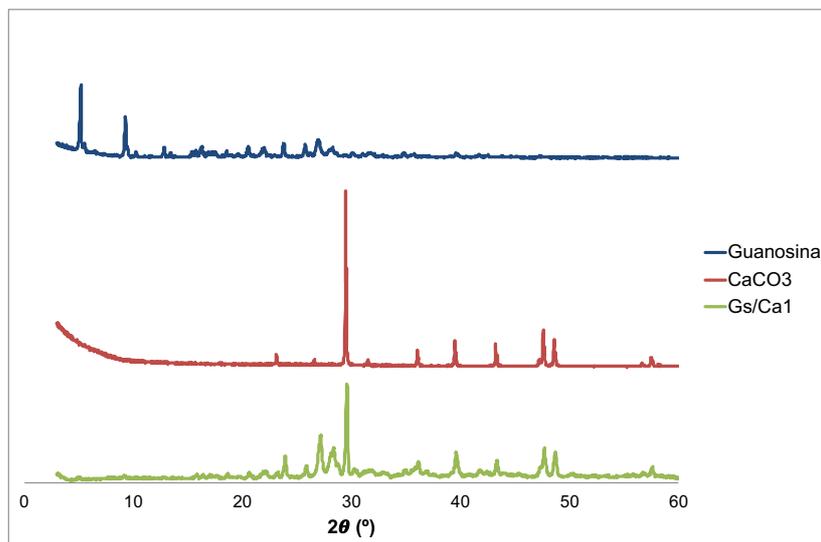


Figura 19 – Análise PXRD da amostra Gs/Ca1 (a verde). Os difratogramas da guanósina e do CaCO₃ estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos

Em seguida prepararam-se amostras de adenosina e citidina com carbonato de magnésio para avaliar a possibilidade de obter as respetivas bases nitrogenadas. Para efeitos comparativos

produziu-se ainda uma amostra de adenosina com carbonato de magnésio (Ade/Mg1), no entanto não foi possível verificar a ocorrência de reação, por PXRD, por isso o respetivo difratograma não é aqui apresentado.

Na amostra Ads/Mg1 verificou-se a formação de hidromagnesite, $3\text{MgCO}_3 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (como se pode comprovar na figura 20), o que indicia que a proporção a usar dever ser 2:1 adenosina: magnésio, ao invés de 1:1, o que foi confirmado pela ocorrência de reação na amostra Ads/Mg2, como se pode verificar na figura 21. Concluiu-se, assim, que foi o excesso de magnésio que favoreceu a formação da hidromagnesite (as setas a laranja, na figura 20, indicam os pontos de coincidência do difratograma da amostra com o difratograma da hidromagnesite). Neste caso o aumento da moagem não produziu alterações significativas na amostra.

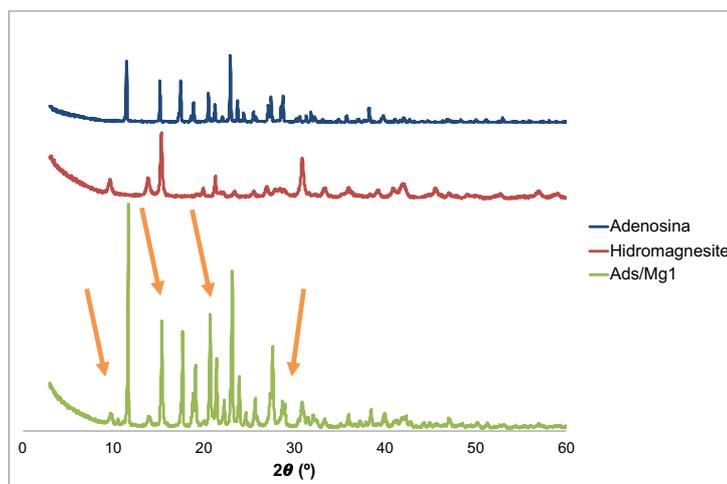


Figura 20 – Análise PXRD da primeira moagem da amostra Ads/Mg1 (a verde). Os difratogramas da adenosina e da hidromagnesite estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos

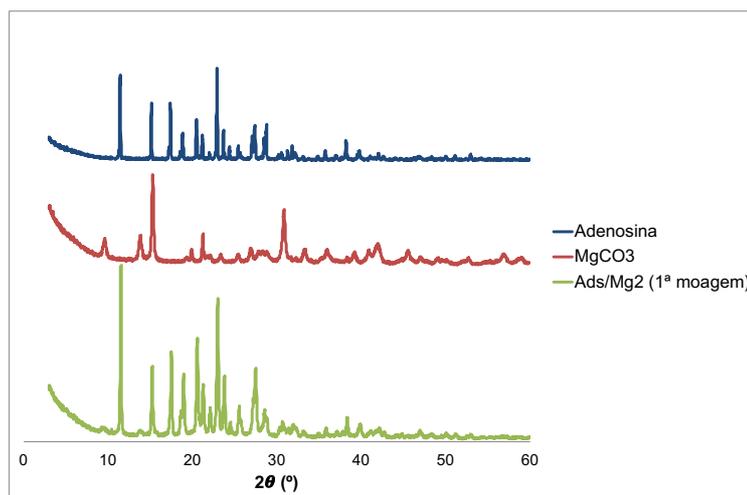


Figura 21 – Análise PXRD da primeira moagem da amostra Ads/Mg2 (a verde). Os difratogramas da adenosina e do MgCO_3 estão representados a azul e vermelho, respetivamente, para efeitos comparativos

Não se verificou reação para a amostra contendo citidina (Cit/Mg1).

5.2 Soluções aquosas sem adição de ácido ou base

Neste ponto do trabalho experimental o objetivo passou por solubilizar e cristalizar, sem adicionar ácido nem base (logo em meio considerado neutro), as amostras preparadas por via mecanoquímica, bem como algumas amostras preparadas em específico para este fim.

Começando pelas amostras de guanosina, existem algumas informações contraditórias em relação à sua solubilidade em meio aquoso. Por um lado, o valor de solubilidade em meio aquoso (0,7 mg/mL⁷⁶) é inferior ao valor da solubilidade da guanina no mesmo meio (2,31 mg/mL⁷⁷), por outro, é expectável que a presença do derivado da ribose aumente a solubilidade, graças à presença de grupos -OH que podem estabelecer pontes de hidrogénio com a água⁷¹.

Uma vez que a amostra Gs/Mg1 não apresentou reação por PXRD, começou por se tentar solubilizar a amostra Gs/Mg2. Para tal recorreu-se a agitação com aquecimento a 50 °C. A amostra foi ainda tratada pela via sonoquímica durante 20 minutos. Esta via caracteriza-se pelo uso de radiação com vista a facilitar a quebra da ligação química dos compostos, o que poderá acelerar o processo reacional, no entanto, também é conhecida a tendência para obter, por recurso a esta via, produtos amorfos, devido aos rápidos arrefecimentos que impossibilitam a formação de uma rede cristalina. Estas conclusões, resultantes de estudos efetuados por *Gedanken*¹²³ foram obtidas após o uso de 20 kHz de radiação. Neste trabalho utilizou-se radiação de 35 kHz, logo é expectável que os efeitos sejam amplificados. A tendência para obter produtos amorfos, após recurso à via sonoquímica, verifica-se, efetivamente, nas amostras contendo guanina, como já foi descrito no capítulo anterior. Este estado vai, em seguida, dificultar a solubilização em meio tendencialmente neutro. Nesta secção estudou-se a resposta da guanosina à solubilização em meio tendencialmente neutro após recurso à supracitada via.

A amostra Gs/Mg2 solubilizou, após o tratamento atrás descrito. A solubilização desta amostra, em que a via sonoquímica foi aplicada, revela-se particularmente importante na medida em que constitui mais uma evidência da diferença de comportamento entre a guanosina e a respetiva base nitrogenada (recorde-se que a guanina não solubilizou quando a via sonoquímica foi aplicada), sublinhando-se assim as diferenças químicas originadas pela presença do derivado da ribose. Após a solubilização, a amostra foi colocada sob radiação solar durante 18 dias, tempo ao fim do qual apresentava um precipitado que foi solubilizado, recorrendo-se, para tal ao mínimo volume de água possível, 1 mL, e, mais uma vez, à via sonoquímica durante 20 minutos. Após vinte e seis dias de exposição solar a amostra apresentava um tom rosado, o que confirma a existência de reação (já verificada por PXRD). Este tom poderá dever-se à formação de um tautómero diferente do inicial, resultante da reação da guanosina com o carbonato de magnésio. Uma vez que a cor só se manifestou após a segunda solubilização inferiu-se que a amostra tinha de estar muito concentrada, hipótese que foi testada mais tarde. Na solubilização da amostra Gs/Mg2 foi, ainda, possível verificar que o arrefecimento rápido conduz à precipitação da

guanósina sob a forma de flocos, desta forma optou-se (tanto nesta amostra como nas restantes) por arrefecimentos lentos após a solubilização total.

O principal objetivo da solubilização da amostra Gs/Mg3 foi aferir se o uso do moinho de bolas seria vantajoso na solubilização de amostras contendo guanósina, ou se, à semelhança das amostras contendo guanina, originaria compostos amorfos cuja solubilização em meio tendencialmente neutro estaria dificultada. Neste caso utilizou-se um total de 13,7 mg de amostra em 4 mL de água, verificando-se que a solubilização ocorreu após aquecimento da amostra (acompanhado de agitação) a 50 °C. O arrefecimento lento originou precipitação por volta de 34 °C, com a amostra a adquirir um aspeto semelhante às amostras de guanina quando não solubilizadas, o que poderá indiciar a degradação do ribonucleósido na respetiva base nitrogenada. A subida de temperatura até 50 °C favoreceu, de novo, a solubilização da amostra. Supõe-se que o carbonato de magnésio esteja ligado a um derivado de guanina, pois, na eventualidade da guanósina se ter degradado em guanina, a solubilização não ocorreria tão facilmente somente pelo aumento de temperatura. Esta amostra foi, em seguida, colocada a evaporar a 40 °C, originando, numa primeira fase, um pó branco nas paredes do recipiente, que foi novamente solubilizado (com recurso a 5 mL de água). Favoreceu-se uma evaporação mais lenta, que foi conseguida ao colocar uma tampa furada no frasco contendo a amostra. O uso desta técnica permitiu reduzir a velocidade de evaporação.

A presença de cor rosa na amostra Gs/Mg2 impulsionou a preparação de novas amostras pela via mecanoquímica. A primeira, a amostra Gs/Mg6 (descrita na tabela 10, onde se encontram também dados de outras amostras produzidas para este passo do trabalho experimental), foi preparada com a mesma composição e proporção, mas em maior quantidade, para aferir a concentração necessária para obter a tonalidade rosa. Após a primeira moagem adicionou-se 0,1 mL de água, verificando-se que o pó branco adquiria uma cor rosa. A continuação da moagem originou uma consistência de pastilha. Tanto a cor como a consistência descritas podem ser observadas na figura 22. A adição de mais 0,1 mL de água à amostra originou o desvanecimento da cor, indiciando que a água, devido ao seu comportamento ácido-base, deve originar uma transformação química da molécula orgânica. Verificou-se, ainda, que a consistência passou a ser a de um creme.

Tabela 10 – Dados sobre a solubilização de amostras de guanosina (preparadas por via mecanoquímica) em meio tendencialmente neutro

Designação da amostra	Composição/Proporção	Massa usada (mg)	Volume de água (mL)	Temperatura de aquecimento
Gs/Mg5	Guanosina: MgCO ₃ /2:1	7,7	5,0	40 °C
Gs/Mg6	Guanosina: MgCO ₃ /2:1	168,0	41	50 °C
Gs/Mg7	Guanosina: MgSO ₄ .7H ₂ O/2:1	208,9	15	55 °C
Gs/Ca1	Guanosina: CaCO ₃ /2:1	117,8	15	Amostra não sujeita a aquecimento
Gs/Li1	Guanosina: Li ₂ CO ₃ /2:1	10,4	5,0	70 °C



Figura 22 – Consistência e cor obtidas após moagem da amostra Gs/Mg6

Foram, em seguida, adicionados 41 mL de água a esta amostra para a solubilizar. Após a solubilização total borbulhou-se dióxido de carbono gasoso (obtido pela reação do ácido sulfúrico com o bicarbonato de potássio) na amostra, verificando-se, neste processo, o aparecimento de partículas verdes na solução. Esta cor já tinha sido observada nos cristais cuja estrutura se apresenta na figura 16. Desta forma há mais uma evidência da possível degradação da guanosina em guanina quando em presença de carbonato de magnésio. A amostra foi, em seguida, dividida em duas frações iguais. Uma delas foi colocada sob radiação solar e a outra na ausência de radiação. Não foi possível caracterizar os precipitados obtidos, por isso o estudo não foi prosseguido.

A amostra Gs/Mg4 não apresentou reação por PXRD. Assim, e para aferir se a cor rosa se deveria ao magnésio ou ao carbonato, preparou-se, por via mecanoquímica, a amostra Gs/Mg7, com a mesma composição de Gs/Mg4 mas na proporção 2:1 (guanósina: magnésio). Adicionou-se, após a primeira moagem, 0,15 mL de água, não se verificando qualquer alteração na coloração. A

amostra foi então solubilizada com 15 mL de água e agitação com aquecimento a 55 °C, tendo-se mantido a agitação durante dois dias. Após este período verificou-se a presença de partículas verdes escuras em suspensão na solução. Estas foram sujeitas a diversas tentativas de solubilização (incluindo com recurso a ácido sulfúrico) que não foram bem-sucedidas. É de destacar que não foi possível replicar estas partículas, nem obtê-las com outros reagentes.

A amostra Gs/Ca1 sofreu um tratamento análogo às amostras Gs/Mg6 e Gs/Mg7 com vista a perceber se a cor rosa se deveria à reação da guanosina com o carbonato, pois, uma vez que a amostra Gs/Mg7 não apresentou tonalidade rosa, esta não se poderia dever exclusivamente ao ião magnésio. Assim, adicionou-se, numa primeira fase, 0,05 mL de água, verificando-se o aparecimento de uma tonalidade rosa no pó previamente branco. A adição de mais 0,1 mL de água conduziu ao desvanecimento desta cor. Concluiu-se, desta forma, que a cor se deve à presença do ião carbonato (recorde-se que na amostra com sulfato de magnésio não se verificou alteração da coloração), o que sugere que este ião poderá ter um papel na decomposição do derivado da ribose da guanosina. Note-se que já existem estudos que comprovam que o carbonato degrada a ribose quando esta não está protegida⁶¹. Para confirmar que a cor resulta da ligação química do ião carbonato à guanosina, adicionou-se água ao carbonato de magnésio isolado, não se verificando qualquer alteração de cor. O facto de só se obter a tonalidade rosa aquando da adição de pequenos volumes de água comprova a necessidade de ter uma solução concentrada, tal como já tinha sido inferido anteriormente. A tonalidade resultará, à partida, da reação ou conjugação de um dos vários tautómeros com o carbonato de magnésio. O comportamento ácido-base da água poderá deslocar o equilíbrio em que esta espécie é obtida, explicando assim porque é que só se observa em soluções concentradas. Estudos posteriores são necessários para aferir as condições exatas de formação do composto colorido, bem como qual o tautómero que o permite originar.

A amostra Gs/Li1, que não tinha apresentado reação por PXRD, foi solubilizada com sucesso a 70 °C. Obtiveram-se cristais com aspeto de agulha, no entanto não foi possível determinar a sua estrutura.

A amostra Gs/Mg5 foi preparada com vista a seguir a reação por ¹H NMR. A dificuldade em solubilizar guanina em meio aquoso, como discutido ao longo do capítulo 4, impediu a comparação de resultados, pois, no caso da guanina só foi possível observar o sinal correspondente à espécie HDO.

De entre as amostras descritas na tabela 10, a amostra Gs/Mg5 foi a única a ser sujeita à via sonoquímica, por um período de 10 minutos. A reação foi seguida por um período de seis semanas, tanto sob radiação solar, como na sua ausência. O espectro inicial apresenta-se na figura 23. O sinal que se observa a 5 ppm é referente ao HDO⁷⁴. O sinal a 6 ppm poderá ser atribuído ao protão 1' (consultar numeração na figura 6) e o sinal a 8 ppm poderá ser atribuído ao protão 8 (seguinte,

igualmente, a numeração apresentada na figura 6)⁷⁴. Este sinal é, provavelmente, da guanina, pois esta apresenta, tipicamente, um sinal a 7,6 ppm¹²⁴. O sinal cujo desvio químico está próximo do HDO (sinalizado pela seta laranja na figura 23) não foi atribuído e foi o que determinou a continuação do estudo. No entanto nenhuma das amostras apresentou alterações significativas ao longo do tempo. Uma vez que não se estudou, nas mesmas condições experimentais, a guanosina sem estar em presença do carbonato de magnésio, não foi possível verificar inequivocamente a degradação.

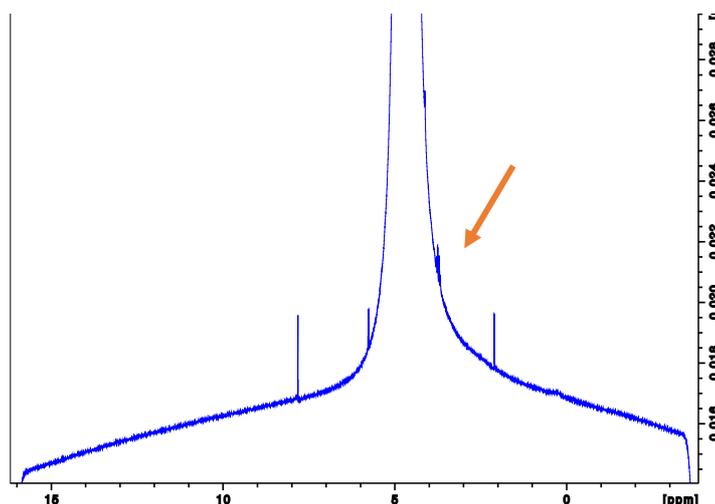


Figura 23 – Primeiro espectro ¹H NMR da amostra Gs/Mg5 (obtido após a preparação da amostra)

A maior facilidade em solubilizar guanosina permitiu concluir que esta molécula é mais solúvel, em meio aquoso, do que a respetiva base nitrogenada, ao contrário do que é sugerido pelos valores obtidos com base em parâmetros teóricos^{76,77}. Estes são obtidos por estimativa, avaliando a contribuição de cada grupo isoladamente e adicionando no final as respetivas contribuições. Na realidade a molécula de guanosina tem de ser vista como um todo, onde a presença dos grupos químicos provenientes do açúcar se revela crucial, por comparação com a guanina, permitindo o estabelecimento de pontes de hidrogénio com a água, e consequentemente, facilitando a sua solubilização.

O último ponto desta secção passou por solubilizar algumas amostras de adenosina e citidina, cujos dados se encontram na tabela 11. Em todos os casos apresentados as solubilizações foram realizadas com agitação e aquecimento a 75 °C.

Tabela 11 – Dados sobre a solubilização de amostras de adenosina e citidina em meio tendencialmente neutro

Designação da amostra	Composição/Proporção	Massa usada (mg)	Volume de água (mL)
Ads/Mg2	Adenosina: MgCO ₃ /2:1	16,7	5,3
Ads/Ca1	Adenosina: CaSO ₄ .2H ₂ O/2:1	21,2	2,0
Ads/Ca2	Adenosina: CaCO ₃ /2:1	17,4	4,0
Cit/Mg2	Citidina: MgCO ₃ /2:1	17,6	5,3
Cit/Ca1	Citidina: CaCl ₂ .2H ₂ O/2:1	55,1	3,0
Cit/Ca2	Citidina: CaSO ₄ .2H ₂ O/2:1	56,5	4,0

A amostra Ads/Mg2, previamente preparada por via mecanoquímica, foi solubilizada em meio aquoso após um período de três horas sob agitação com aquecimento a 75 °C. Favoreceu-se, em seguida, um arrefecimento lento após o qual a amostra foi separada em duas frações iguais, uma foi colocada a evaporar sob radiação solar e a outra na ausência de radiação. A amostra que esteve na ausência de radiação apresentava, ao fim de doze dias, um precipitado branco, cuja caracterização não foi possível. Por outro lado, a amostra sujeita ao efeito da radiação solar apresentava, ao fim de 36 dias, uma partícula verde clara (esta coloração é análoga à observada nos cristais cuja estrutura se apresenta na figura 16) com aspeto cristalino. O facto de a partícula colorida só ter aparecido na amostra sujeita ao efeito da radiação solar indicia que esta pode ter um contributo no processo reacional. Esta partícula foi solubilizada com recurso a 1 mL de água e agitação com aquecimento a 40 °C, no entanto não foi obtida novamente. Posteriormente tentou replicar-se esta amostra, mas utilizando um menor volume de água na solubilização, no entanto não foi possível voltar a obter o precipitado verde. Mencione-se, ainda, a importância da água na obtenção desta estrutura, que poderá decorrer da hidrólise de uma forma tautomérica, o que é sugerido pelo facto de ser obtida após secagem total da amostra (o que ocorreu igualmente quando se obteve a estrutura apresentada na figura 16). Testou-se, ainda, a possibilidade de solubilizar uma massa total de 40,7 mg, neste caso recorrendo a 13 mL de água (amostra Ads/Mg2.1). Aqui a solubilização tornou-se difícil, possivelmente devido à massa elevada de amostra ou à sua decomposição em adenina que, por não possuir o derivado do açúcar será tendencialmente menos solúvel que o respetivo nucleósido. Note-se que a solubilidade da adenosina é de 5,1 mg/mL¹²⁵ ao passo que a da adenina é de apenas 1,03 mg/mL¹²⁶. Estudos posteriores serão necessários para clarificar qual a composição do composto colorido, bem como quais as condições experimentais que o permitem obter.

A amostra Ads/Ca1 foi preparada por via mecanoquímica e em seguida solubilizada a quente (mantendo-se sob aquecimento durante duas horas). Neste caso, à semelhança do caso anterior, foi preferido um arrefecimento lento. Após o arrefecimento obteve-se um precipitado branco com aspeto de gel, o qual poderá ser importante para confinar os reagentes e os produtos. Existem já estudos que revelam a importância pré-biológica dos géis¹¹³. Foram realizadas experiências

posteriores com esta amostra concluindo-se que as duas horas de aquecimento são fundamentais para a obtenção do precipitado com aspeto de gel. O facto de ter sido possível solubilizar, a quente, uma amostra contendo cálcio, bem como a comparação com a experiência de *Franco et al*¹¹³, inspirou a tentativa de efetuar reações de fosforilação utilizando hidroxiapatite, assunto a abordar em detalhe no capítulo 6.

Por fim, no referente às amostras de adenosina, testou-se a possibilidade de solubilizar adenosina com carbonato de cálcio, amostra Ads/Ca2. Esta amostra foi preparada, numa primeira fase, por via mecanoquímica, e em seguida solubilizada. Utilizou-se 4 mL de água e recorreu-se a agitação com aquecimento (75 °C) não se tendo conseguido uma solubilização total. A dificuldade de solubilização desta amostra, quando comparada com a amostra contendo carbonato de magnésio deve-se, provavelmente, à menor solubilidade do carbonato de cálcio em meio aquoso.

No caso das amostras contendo citidina, a amostra Cit/Mg2 foi colocada em agitação com aquecimento durante três horas, período ao fim do qual se favoreceu o arrefecimento lento. Ao fim de um dia a amostra apresentava um aspeto viscoso. Adicionou-se 2 mL de água para solubilizar novamente a amostra, aquecendo-a (com agitação) a 70 °C durante uma hora. Verificou-se, após arrefecimento rápido, a formação de precipitado, que foi separado da solução. A solução foi, por seu turno, dividida em duas frações iguais, uma foi colocada a evaporar sob radiação solar e a outra na ausência de radiação. Esta solubilização foi mais difícil do que a solubilização das amostras de adenosina, o que se comprovou pela tendência para a formação de precipitado, que foi separado da solução. No entanto, ressalve-se, que a solubilidade estimada é superior para a citidina (43,8 mg/mL¹²⁷) quando comparada com a da adenosina. Desta forma, a maior dificuldade de solubilização verificada poderá dever-se à associação da citidina com o carbonato de magnésio, formando um composto insolúvel, ou ao facto de o valor de solubilidade da citidina ser um valor teórico estimado, que, portanto, pode não refletir corretamente a solubilidade real (à semelhança do que já foi verificado na comparação das solubilidades da guanina e guanosina). No caso da amostra que não foi submetida à radiação verificou-se, ao fim de doze dias, que tinha formado um precipitado com partículas brancas. O estudo não foi prosseguido, nem para esta amostra, nem para a amostra sob radiação solar, uma vez que não seria possível determinar a estrutura química dos precipitados de forma cabal.

Algumas estruturas de citidina coordenada com catiões cálcio já são conhecidas, nomeadamente quando em presença de clorato⁸⁴. Neste trabalho avaliou-se o comportamento, em meio tendencialmente neutro, da citidina quando coordenada com o cloreto de cálcio na proporção 2:1 (amostra Cit/Ca1), verificando-se que esta amostra foi mais facilmente solubilizada que a amostra Cit/Mg2, o que pode resultar do facto de o cloreto ser um ião mais solúvel que o carbonato. Neste caso o aquecimento com agitação decorreu durante três horas, tempo ao fim do qual a amostra foi arrefecida lentamente. No entanto não foi possível caracterizar o precipitado obtido, não se tendo prosseguido o estudo desta amostra.

Por fim a amostra Cit/Ca2, preparada por via mecanoquímica, foi solubilizada a quente, tendo para tal, sido aquecida por um período de duas horas. Favoreceu-se o arrefecimento lento da amostra, sem agitação, verificando-se a formação de precipitado (a cerca de 27 °C), que foi separado da solução. A solução foi, por seu turno, colocada a evaporar sob radiação solar. Ao fim de quinze dias verificou-se a existência de cristais brancos, que, por SCXRD, se conclui ser citidina. A citidina não apresentava vestígios de ligação ao sulfato de cálcio, supondo-se assim que este terá precipitado aquando do arrefecimento, fruto da sua baixa solubilidade em meio aquoso. Esta terá impedido a complexação do ião cálcio com a citidina, por oposição ao que está descrito para os contra-íões cloreto⁸³ e clorato⁸⁴.

5.3 Soluções aquosas em meio ácido

A amostra Gs/Mg3, solubilizada em meio tendencialmente neutro, apresentou, após arrefecimento, o aspeto visual das amostras contendo guanina (verificou-se a precipitação de flocos brancos na solução). Assim decidiu-se solubilizar esta amostra em meio ácido, uma vez que este, por favorecer a protonação, já se tinha revelado vantajoso para solubilizar as amostras de guanina. Testou-se, igualmente, a possibilidade de solubilizar a amostra de adenosina (Ads/Mg2.1) cuja solubilização em meio tendencialmente neutro se apresentou dificultada, mais uma vez assumindo que a protonação favorecida pelo meio ácido seria vantajosa.

A amostra Gs/Mg8 (previamente Gs/Mg3) foi solubilizada recorrendo a uma concentração de 0,32 M de ácido clorídrico. A amostra foi solubilizada recorrendo a aquecimento (25 °C) com agitação. Após a solubilização, a amostra foi separada em três frações iguais, uma foi colocada sob o efeito de radiação solar, uma outra foi colocada na ausência de radiação e a terceira foi colocada numa temperatura inferior à temperatura ambiente, no frigorífico a cerca de 4 °C. Ao fim de dez dias a amostra sob radiação solar apresentava um precipitado que se verificou, por SCXRD, ser guanina hidrocloreada mono-hidratada. A sua estrutura encontra-se na figura 24. Não foi possível caracterizar os precipitados das outras duas amostras.

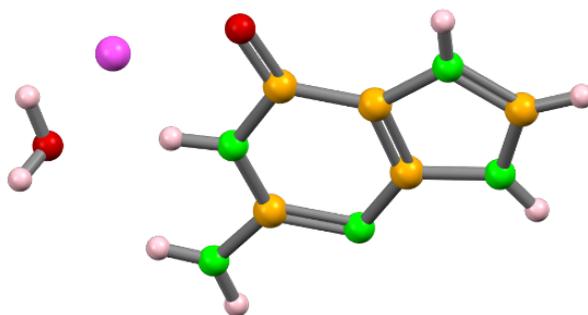


Figura 24 – Estrutura da guanina hidroclorada mono-hidratada obtida após solubilização em meio ácido de uma amostra de guanósina com carbonato de magnésio. A verde apresentam-se os átomos de nitrogénio, a amarelo os de carbono, a vermelho os de oxigénio, a roxo o cloro e a rosa os hidrogénios

Apesar desta estrutura já estar descrita na literatura¹¹⁹, o facto de ter sido obtida a partir de uma solução, em meio ácido, de guanósina com carbonato de magnésio permite comprovar que a degradação do ribonucleósido na base nitrogenada é possível. Refira-se, ainda, que na literatura¹¹⁹ a cristalização da guanina é efetuada a uma temperatura (34,8 °C) superior à utilizada no presente trabalho e recorrendo a uma concentração de ácido clorídrico (18%) também superior.

Estudos posteriores devem ser levados a cabo para aferir se a degradação ocorre devido à ação do ácido, do carbonato de magnésio ou se resultará de uma interação de ambos com a guanósina. Estão documentados casos de degradação da guanósina em guanina em meio ácido, mas recorrendo a ácido perclórico, cujo poder oxidante é superior ao do ácido clorídrico (o que poderá favorecer a degradação dos grupos -OH da guanósina), e utilizando uma concentração superior (5 M) à utilizada no presente trabalho¹²⁸. Apesar deste dado não poder ser desvalorizado, não é possível fazer uma comparação inequívoca entre as duas situações. Acresce, no presente trabalho, a verificação, à vista desarmada, (descrita no ponto 5.2) de um comportamento, para esta amostra, em meio tendencialmente neutro, semelhante ao verificado para amostras de guanina no mesmo meio (precipitação em flocos brancos, após solubilização, aquando do arrefecimento), o que indicava já a degradação. Esta constatação é, ainda, complementada com a observação, em meio tendencialmente neutro, de uma tonalidade rosa em amostras de guanósina com carbonato quando bastante concentradas. Esta tonalidade poderá dever-se à reação de um tautómero de guanósina diferente do inicial com o carbonato, ou alternativamente, à degradação da guanósina em guanina e reação de um tautómero desta com o carbonato. O meio ácido foi fundamental para facilitar a solubilização, permitindo posteriormente obter o cristal, no entanto poderá não ter sido essencial ao processo reacional. Importa, igualmente, clarificar a ação do carbonato na reação, para perceber se o magnésio é essencial ou se, alternativamente, a estrutura poderá ser obtida com recurso a outros carbonatos, nomeadamente de cálcio e lítio. Recorde-se que a ribose, quando não está protegida, reage com o carbonato degradando-se⁶¹, o que sugere que este poderá ter um papel ativo na degradação da guanósina em guanina. É ainda de notar que a estrutura presente na figura 16 mostra a degradação da ribose resultante da reação da guanósina com carbonato de magnésio. Refira-se, por fim, que a estrutura da guanina hidroclorada mono-hidratada foi

obtida após dez dias de exposição solar, o que indicia que a radiação poderá ter um papel ativo na reação, no entanto estudos posteriores serão necessários para clarificar esta hipótese.

Na literatura¹¹⁹ é ainda referido que dois sais de guanina diferentes podem ser obtidos em meio ácido (recorrendo a ácido clorídrico), são eles a guanina hidrociorada mono e di-hidratada¹²⁰. Neste trabalho obteve-se unicamente a estrutura mono-hidratada, que é a que necessita de condições mais específicas para ser cristalizada. Esta estrutura caracteriza-se por apresentar uma molécula de água ligada ao átomo de nitrogénio 7 (ver numeração na figura 6). Já na estrutura di-hidratada, para além da molécula ligada ao átomo de nitrogénio 7, existe ainda uma segunda molécula de água ligada simultaneamente ao átomo de nitrogénio 9 de uma molécula de guanina e ao átomo de oxigénio 6 de uma outra molécula de guanina. A ligação das moléculas de água deve ocorrer quando a guanina já se encontra próxima da cristalização. No caso da guanosina, o facto de o átomo de nitrogénio 9 estar ligado quimicamente ao açúcar impede a ligação da molécula de água, o que poderá facilitar a formação da estrutura mono-hidratada. A ribose, na degradação, deverá separar-se progressivamente da guanina, sendo que o átomo de nitrogénio 9 só deve ficar totalmente livre já próximo do estado sólido, o que impedirá a ligação da molécula de água nesta posição. Esta hipótese é, ainda, fundamentada pela evidência de protonação do átomo de nitrogénio 7 da guanosina, quando este ribonucleósido se encontra em meio ácido¹²⁹.

Uma amostra de adenosina com carbonato de magnésio, em meio tendencialmente neutro, tinha já apresentado um precipitado verde (cor obtida igualmente nos cristais cuja estrutura que se apresenta na figura 16) indiciando assim que a degradação deste ribonucleósido na respetiva base nitrogenada será, à semelhança da degradação da guanosina em guanina, possível. No entanto não foi possível caracterizar o precipitado obtido, nem replicá-lo (como descrito na secção 5.2). Assim, para verificar se a degradação e a cristalização seriam facilitadas pelo uso do meio ácido, adicionou-se ácido à amostra Ads/Mg2.1, previamente descrita na secção 5.2. Na preparação desta amostra, pela via mecanoquímica, não se recorreu ao uso do moinho de bolas, equipamento este que foi utilizado aquando da preparação da amostra Gs/Mg8. Após uma tentativa de solubilização (da amostra Ads/Mg2.1) em meio aquoso sem adição de ácido ou base que não foi bem-sucedida, separou-se a solução do precipitado. Em seguida adicionou-se, ao precipitado, ácido clorídrico (1,37 M) verificando-se a rápida solubilização. A amostra foi colocada a evaporar sob radiação solar, não tendo sido possível obter uma estrutura, em tempo útil, para efetuar a caracterização.

Importa referir que, no caso da guanosina em meio ácido, a sua estrutura na forma hidrociorada não está descrita na literatura, o mesmo não sendo válido para a adenosina nem para a citidina. No caso da adenosina, a estrutura na forma hidrociorada é conhecida¹³⁰, e os respetivos cristais foram caracterizados após cristalização a partir de uma solução de etanol a 0 °C¹³¹. É, igualmente, conhecida uma estrutura de adenina hidrociorada hemi-hidratada, obtida a partir de uma solução 38% HCl após evaporação a 36,8 °C¹³² (condições estas bastante diferentes das utilizadas ao longo deste trabalho experimental). O meio ácido não será, neste caso, o mais indicado para

estudar a degradação do ribonucleósido na respetiva base nitrogenada, uma vez que haverá tendência para obter adenosina na sua forma hidroclorada. Desta forma é crucial realizar estudos noutros meios para aferir a possibilidade de degradação com recurso ao carbonato, recorde-se a ação deste anião na degradação da ribose⁶¹. Destaque-se, aqui, a necessidade de estudar mais a fundo o comportamento da adenosina em meio neutro. O meio ácido foi utilizado para a guanosina como forma de aumentar a sua solubilidade, não se acreditando que seja essencial ao processo de degradação. Uma vez que a adenosina é, de acordo com os valores teóricos, mais solúvel em meio neutro (5,1 mg/mL¹²⁵) do que a guanosina (0,7 mg/mL⁷⁶) é possível que a solubilização após a degradação ocorra sem necessidade de recorrer ao meio ácido.

A citidina não foi estudada em meio ácido por, contrariamente às amostras de guanosina e adenosina, não ter evidenciado degradação no meio tendencialmente neutro. No entanto é de notar que este ribonucleósido, à semelhança da adenosina, pode existir na forma hidroclorada¹³³, por isso, mais uma vez, o meio ácido poderá não ser o mais indicado para estudar a sua degradação em citosina.

Capítulo 6: Estudos preliminares de reações de fosforilação

A segunda parte deste trabalho experimental consistiu em estudar a possibilidade de fosforilar ribonucleósidos na posição 5', posição onde o fosfato aparece habitualmente ligado (como se mostra na figura 9).

Para cumprir o objetivo proposto prepararam-se amostras de guanosina, adenosina e citidina com hidroxiapatite. Este mineral foi escolhido por ser constituído, simultaneamente, por cálcio e fosfato. Espera-se que o cálcio possa proteger as posições 2' e 3' (à semelhança do que já foi descrito ao longo do capítulo 1), deixando livre para a reação a posição pretendida, 5'. O cálcio, na sua forma de cloreto, pode formar um complexo com a citosina, estabilizando esta base nitrogenada⁸³.

A apatite é a fonte de fosfato mais significativa no planeta Terra^{1,57}, no entanto, a sua limitada solubilidade¹³⁴ em meio aquoso neutro obriga à utilização de mecanismos para a sua protonação e solubilização, nomeadamente recorrendo à ativação por parte do cianato¹³⁵. Este, apesar de ser um provável reagente pré-biológico, é instável, limitando os ambientes em que a síntese de ribonucleósidos poderá ter ocorrido na Terra primitiva¹³⁶. Assim, a possibilidade de solubilizar hidroxiapatite quando em presença dos ribonucleósidos, favorecendo em seguida a fosforilação (através da adição de ureia) poderá abrir novas portas ao estudo deste tipo de reações no ambiente terrestre primitivo. Neste caso a presença do ião cálcio poderia favorecer a proteção das posições 2' e 3', permitindo que a fosforilação ocorresse na posição 5' (posição onde o fosfato aparece habitualmente ligado aos ribonucleósidos). Este método obrigaria à solubilização dos iões cálcio e fosfato, mas garantiria a fosforilação na posição pretendida, o que não é possível garantir ao utilizar outros métodos, nomeadamente a hidroxiapatite em conjunto com oxalato de amónia e agentes condensantes¹³⁵.

A estrutura conhecida da citosina com cloreto de cálcio⁸³ indicia que o ião cálcio pode, efetivamente, ligar-se a esta base nitrogenada. No entanto, os estudos preliminares realizados utilizando citidina e sulfato de cálcio na proporção 2:1 (amostra Cit/Ca₂) indicaram que a baixa solubilidade do sulfato de cálcio impediria a sua solubilização e conseqüentemente a ligação à citidina. Desta forma esperava-se o mesmo resultado para a citidina na presença de hidroxiapatite, pois esta é praticamente insolúvel em meio tendencialmente neutro¹³⁷. Ainda assim tentou solubilizar-se, a 90 °C, uma amostra contendo citidina e hidroxiapatite (na proporção 2:1 citidina: cálcio), recorrendo para tal a 15 mL de água. Verificou-se solubilização praticamente total, mas, após arrefecimento lento, verificou-se a existência de um precipitado branco. Este deve ser hidroxiapatite que não solubilizou e, portanto, não reagiu. O estudo desta amostra não foi prosseguido.

No caso das amostras de adenosina e guanosina, bem como na amostra “mista” (contendo ambos os nucleósidos), testou-se, numa primeira fase, a possibilidade de realizar a reação de fosforilação num volume de água de 2,5 mL. As amostras fizeram 8 ciclos alternando a presença dos reagentes em meio aquoso e em seco, após os quais foram analisadas por ^{31}P NMR. Não foi possível obter resultados conclusivos, o que derivará, possivelmente, da dificuldade de solubilização no volume pretendido. Assim, testou-se, em seguida, a possibilidade de solubilizar os reagentes num volume de água superior, esperando que tal apresentasse vantagens para a reação. Verificou-se solubilização recorrendo a aquecimento a 90 °C e volume de água entre 10 e 11 mL. Realizaram-se, neste caso, 9 ciclos, para verificar se o aumento (do número de ciclos), face à situação anterior, seria vantajoso. Admitiu-se que a concentração de fosfato, no volume de água usado, não seria suficiente para que este fosse detetado por ^{31}P NMR. Assim solubilizou-se cada amostra, após os 9 ciclos, num total de 1 mL de água. As soluções resultantes continham muito precipitado. A análise ^{31}P NMR não permitiu obter resultados conclusivos. Supõe-se que a hidroxiapatite não tenha solubilizado neste volume, e, portanto, não tenha reagido, o que se confirmou pela ausência de sinais no espetro. No capítulo 7 sugerem-se algumas alternativas para este estudo.

Capítulo 7: Considerações finais e perspectivas

A realização deste trabalho experimental teve duas grandes componentes, cujos resultados mais relevantes se analisam em seguida, apresentando-se simultaneamente sugestões de estudos futuros.

Numa primeira instância avaliou-se a possibilidade de degradar alguns ribonucleósidos nas respectivas bases nitrogenadas. Apesar do foco principal ter sido a guanosina, foram, também, estudadas algumas amostras de adenosina e citidina.

A guanosina foi o ribonucleósido fulcral deste trabalho pois existem já estudos que comprovam a sua degradação na respetiva base nitrogenada quando em presença de radiação cósmica¹⁰⁰. Adicionalmente é de notar que a guanina, base nitrogenada presente na guanosina, é a mais abundante nos condritos carbonáceos, o que fundamenta a pertinência da escolha da guanosina como composto principal⁴⁵.

A estrutura de guanina hidrociorada mono-hidratada, conseguida após solubilização de uma amostra contendo guanosina e carbonato de magnésio (na proporção 2:1) em meio ácido, constitui o resultado que merece maior destaque. Este resultado, fundamentado pela obtenção de coloração aquando da solubilização da mesma amostra em meio tendencialmente neutro, bem como pelos resultados preliminares obtidos por *Carvalho et al*¹⁰¹, permitiu confirmar a hipótese inicial de que a guanosina pode degradar-se em guanina quando em presença de carbonato de magnésio. Sublinhe-se, igualmente, a existência de estudos que apontam o carbonato como responsável pela degradação da ribose⁶¹, que é, conceptualmente, um dos componentes da guanosina. No presente trabalho, o que se degradou foi, por sinal, o derivado da ribose da guanosina. No entanto, serão necessários estudos posteriores para confirmar se a degradação não se pode dever, em certas circunstâncias, à ação do ácido (recorde-se que a guanosina degrada em guanina, quando em meio ácido, mas utilizando um ácido mais oxidante e concentrações superiores¹²⁸). Um estudo que poderá ser feito, neste campo, passa por seguir a reação por ¹H NMR, em meio ácido e não em meio tendencialmente neutro, como foi feito na secção **5.2**. Neste caso será necessário adaptar as condições experimentais. Desta forma poderá ser possível identificar a degradação e quantificá-la. É de referir que na estrutura da guanosina, o carbono 5' (consultar numeração na figura 6) da ribose é o único que possuiu dois prótons, logo é facilmente identificável por ¹H NMR. Caso desapareça completamente do espetro pode concluir-se que a reação ocorreu na totalidade, caso contrário é possível, por integração de sinais, saber qual a percentagem de ribonucleósido que se transformou na base nitrogenada.

O carbonato de magnésio foi utilizado por ser simultaneamente um reagente pré-biológico relevante e um modelo laboratorial adequado (como referido no capítulo 1). No entanto, estudos posteriores poderão vir a revelar que esta degradação é viável utilizando outros carbonatos, nomeadamente de cálcio e lítio, testando-se assim, igualmente, o efeito específico do ião magnésio.

No caso da adenosina verificou-se que, após solubilização em meio tendencialmente neutro com carbonato de magnésio (na proporção 2:1) e exposição à radiação solar, se obteve um precipitado verde. Este, por possuir a mesma cor que o obtido por *Carvalho et al*¹⁰¹ poderá ser uma evidência da degradação da adenosina em adenina. Da mesma forma são necessários estudos posteriores para confirmar esta hipótese. Uma vez que não foi possível replicar o precipitado verde, mas que se acredita que este será instável em meio aquoso, surgindo apenas em estado sólido, um estudo posterior passará por tentar precipitar este composto com recurso a solventes apróticos (como a acetona) como solventes externos, ou alternativamente recristalizá-lo num solvente não aquoso. Neste caso será interessante estudar, ainda, o efeito do moinho de bolas (recorde-se que este equipamento foi utilizado na amostra de guanosina que originou guanina hidrocloreada mono-hidratada). A utilização de meio ácido, no caso da adenosina, provavelmente, não produzirá resultados conclusivos. À semelhança do que foi feito para a amostra de guanosina, será interessante seguir, por ¹H NMR, em meio tendencialmente neutro, a reação da adenosina com o carbonato de magnésio.

Caso o estudo por ¹H NMR não permita, para nenhuma dos ribonucleósidos, obter resultados conclusivos, o que poderá ocorrer caso a solução não esteja suficientemente concentrada (neste caso o sinal correspondente à espécie HDO poderá dificultar a integração dos restantes sinais, e, conseqüentemente a quantificação da reação), a reação poderá ser seguida, alternativamente, por ¹³C NMR. Neste caso, para além da análise ser mais demorada, o que decorre do facto do carbono 13 ser pouco abundante, será necessário recorrer a um agente paramagnético (como, por exemplo um sal de cromo(III)) para que a integração seja possível (caso não se recorra a este agente o tempo de relaxação de cada carbono será distinto, sendo impossível relacionar a área dos sinais com a concentração). Uma outra alternativa será seguir a reação por cromatografia líquida de alta eficiência ou HPLC (da nomenclatura inglesa *High Performance Liquid Chromatography*). Esta técnica apresenta como vantagem o facto de ser mais rápida que o ¹³C NMR. Já existem estudos de separação de nucleósidos modificados dos nucleósidos típicos do DNA e RNA recorrendo a HPLC de fase reversa, bem como estudos de separação de bases nitrogenadas de nucleósidos recorrendo a HPLC de fase normal (neste caso utilizando uma coluna de sílica gel substituída com um grupo amino)¹³⁸. Adicionalmente, também estão descritos estudos em que se utilizou HPLC de fase reversa com troca iónica¹³⁹, concluindo-se, portanto, que existem vários tipos de HPLC que se podem utilizar nesta análise.

A solubilização de uma amostra de guanina com sulfato de magnésio em meio ácido permitiu obter sulfato de guanina hemi-hidratada, esta estrutura, apesar de não estar no âmbito do presente trabalho, constitui uma novidade e, portanto, merece ser referida. Um estudo posterior a realizar consistirá em avaliar a possibilidade de obter a mesma estrutura partindo do ribonucleósido.

Futuramente será interessante avaliar a possibilidade de degradação dos ribonucleósidos nas respetivas bases nitrogenadas noutras condições reacionais. Será, ainda, pertinente, prosseguir o estudo para aferir se o nucleósido se poderá formar, por passos, diretamente ligado à ribose. Um argumento a favor desta hipótese prende-se com a dificuldade, na síntese abiótica, partindo de cada

componente isolado, em conjugar as configurações de regioespecificidade e estereoespecificidade necessárias. É, adicionalmente, importante destacar o desenvolvimento de novos caminhos reacionais para obter pirimidinas, partindo de moléculas mais simples¹ (ao invés dos componentes conhecidos), o que poderá, também, fundamentar a síntese do ribonucleósido diretamente ligado à ribose.

Caso a hipótese de síntese dos ribonucléotidos venha a ser confirmada, aliada às evidências de degradação confirmadas neste trabalho, será possível explicar porque é que se encontram apenas as bases nitrogenadas nos meteoritos. Salienta-se que a preparação das amostras provenientes dos meteoritos é feita com recurso a ácido fórmico e temperaturas elevadas (da ordem de 100 °C)²⁴, sendo utilizado ácido clorídrico para preparar as amostras para a cromatografia⁴³. Estas condições poderão, por si só, originar a degradação do ribonucleósido na respetiva base nitrogenada (sublinhe-se, mais uma vez, a importância de perceber o papel do ácido na degradação), portanto estudos posteriores, recorrendo a condições mais suaves de extração, poderão ser necessários.

Como comprovado ao longo deste trabalho experimental as diversas formas tautoméricas da guanina e da guanosina podem originar compostos distintos após reação com alguns sais inorgânicos. O estudo da reatividade destas moléculas revela-se, atualmente, fundamental, pois poderá permitir a funcionalização das mesmas para aplicações biológicas e farmacêuticas. No caso da guanosina, a sua funcionalização permite que seja usada como agente antiviral, por exemplo, no tratamento do HIV¹⁴⁰. A guanina tem sido aplicada ao fabrico de catalisadores sólidos, como o SBA-16-G, que pode ser utilizado para remover metais tóxicos de soluções aquosas¹⁴¹. Destaca-se, como vantagem deste tipo de catalisadores, o facto de serem livres de metais, fáceis de sintetizar e caracterizar, bem como recicláveis (até quatro vezes) sem perda significativa da atividade catalítica¹⁴². A guanina pode, ainda, ser funcionalizada, em conjugação com nano partículas de sílica, sendo aplicada à deteção da necrose de tumores¹⁴³.

A segunda parte do trabalho experimental passou por aferir a possibilidade de fosforilar ribonucleósidos, na posição 5', recorrendo à hidroxiapatite. Este mineral, por conter cálcio, favorecerá a proteção das posições 2' e 3', obrigando a fosforilação a ocorrer na posição pretendida.

Não foi possível obter resultados na segunda parte do trabalho, o que se poderá dever à não solubilização da hidroxiapatite no volume de água pretendido. Existem já estudos em que foi possível obter um sinal de ³¹P NMR da hidroxiapatite quando conjugada com guanosina¹¹³, no entanto utilizou-se um número de ciclos superior, bem como o ião borato. Este, para além de poder, tal como o cálcio, proteger as posições 2' e 3', permite ainda retirar cálcio à hidroxiapatite, o que poderá aumentar a solubilidade do fosfato. Adicionalmente destaque-se, nos referidos estudos, o uso de fosfato de potássio como fonte de fosfato. O potássio poderá, igualmente, aumentar a solubilidade do fosfato. Desta forma, uma maneira de tornar o método proposto mais eficiente, passará por adicionar borato de sódio às amostras. Este, para além de poder ter ocorrido no mundo pré-biológico nas formas de urlexite

e kernite¹⁴⁴, apresenta ainda como vantagem a possibilidade de aumentar a solubilidade da hidroxiapatite, garantindo, simultaneamente, a proteção das posições 2' e 3'.

Referências bibliográficas

1. N. Kitadai and S. Maruyama, Origins of building blocks of life: A review, *Geosci. Front.*, vol. 9, no. 4, pp. 1117 – 1153, **2018**.
2. P. G. Higgs, Origin of life, RNA World and, *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, vol. 3. Elsevier, pp. 175 – 180, **2016**.
3. F. Westall and A. Brack, The importance of water for life, *Space Sci. Rev.*, vol. 50, no. 2, pp. 1 - 23, **2018**.
4. L. J. Rothschild, The sun: The impetus for life, *Evol. Planet Earth Impact Phys. Environ.*, pp. 87–107, **2003**.
5. H. Lammer, A. L. Zerkle, S. Gebauer, N. Tosli, L. Noack, M. Scherf, E. P. Lohinger, M. Güdel, J. L. Grenfell, M. Godolt and A. Nikolaou, Origin and evolution of the atmospheres of early Venus, Earth and Mars, *Astron. Astrophys. Rev.*, vol. 26, no. 1, **2018**.
6. E. M. Galimov, Role of low solar luminosity in the history of the biosphere, *Geochemistry Int.*, vol. 55, no. 5, pp. 401– 417, **2017**.
7. J. S. Greaves, Persistent hazardous environments around stars older than the Sun, *Int. J. Astrobiol.*, vol. 5, no. 3, pp. 187–190, **2006**.
8. K. R. Grazier, Jupiter: Cosmic jekyll and hyde, *Astrobiology*, vol. 16, no. 1, pp. 23 – 38, **2016**.
9. D. de Niem, E. Kührt, A. Morbidelli and U. Motschmann, Atmospheric erosion and replenishment induced by impacts upon the Earth and Mars during a heavy bombardment, *Icarus*, vol. 221, no. 2, pp. 495 – 507, **2012**.
10. D. Koschny, R. H. Soja, C. Engrand, G. F. Flynn, J. Lasue, A. C. L. Regourd, D. Malaspina, T. Nakamura, A. R. Poppe, V. J. Sterken and J. M. T. Rodríguez, Interplanetary dust, meteoroids, meteors and meteorites, *Space Sci. Rev.*, vol. 215, no. 4, **2019**.
11. K. R. Lang, Sun, Earth and sky, *Earth, Moon Planets*, vol. 70, pp. 1 – 20, **1995**.
12. L. T. Ackert, Origins of Life, History of, *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, vol. 3. Elsevier, pp. 181 – 185, **2016**.
13. A. F. N. Amaral, Boro: um elemento fundamental nos primórdios da vida na Terra? (Tese de Mestrado), Instituto Superior Técnico, Lisboa, **2007**.
14. B. L. Ligon, Louis Pasteur: a controversial figure in a debate on scientific ethics, *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 2, pp. 134 – 141, **2002**.
15. Experiencias que refutaron a la generación espontánea. [Online]. Available: <https://pt.slideshare.net/LuBafa/experiencias-que-refutaron-a-la-generacin-espontnea/3>. [Accessed: 23-Jul-2019].
16. S. Maruyama, K. Kurokawa, T. Ebisuzaki, Y. Sawaki, K. Suda and M. Santosh, Nine requirements for the origin of Earth's life: Not at the hydrothermal vent, but in a nuclear geyser system, *Geosci. Front.*, pp. 1 – 21, **2018**.
17. S. Arrhenius, *Worlds in the making - The evolution of the universe*. Harper & Brothers, **1903**.
18. A. I. Oparin, The origin of life, Dover Pubns, London, pp. 199 – 234, **1967**.
19. J. B. S. Haldane, The origin of life, *Origin of Life. The Rationalist Annual*, vol. 148, pp. 3 – 10,

1929.

20. S. L. Miller, A production of amino acids under possible primitive earth conditions, *Science*, vol. 117, no. 3046, pp. 528 – 529, **1953**.
21. S. L. Miller and H. C. Urey, Organic compound synthesis on the primitive earth, *Science*, vol. 130, no. 3370, pp. 245 – 251, **1959**.
22. A. C. Franco Banha, Estudo de meios pré-biológicos contendo silicato e borato (Tese de Mestrado), Instituto Superior Técnico, Lisboa, **2017**.
23. N. C. Wickramasinghe, Formaldehyde polymers in interstellar space, *Nature*, vol. 252, **1974**.
24. A. S. Burton, J. C. Stern, J. E. Elsila, D. P. Glavin and J. P. Dworkin, Understanding prebiotic chemistry through the analysis of extraterrestrial amino acids and nucleobases in meteorites, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 16, pp. 5459 – 5472, **2012**.
25. E. Herbst, The synthesis of large interstellar molecules, *Int. Rev. Phys. Chem.*, **2017**.
26. M. P. Callahan, K. E. Smith, H. J. C. II, J. Ruzicka, J. C. Stern, D. P. Glavin, C. H. House and J. P. Dworkin, Carbonaceous meteorites contain a wide range of extraterrestrial nucleobases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 34, pp. 13995 – 13998, **2011**.
27. Y. Furukawa, Y. Chikaraishi, N. Ohkouchi, N. O. Ogawa, D. P. Glavin, J. P. Dworkin, C. Abe and T. Nakamura, Extraterrestrial ribose and other sugars in primitive meteorites, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2019**.
28. J. F. Kasting, The evolution of the prebiotic atmosphere, *Orig. Life*, vol. 14, **1984**.
29. L. E. Bonnefoy, A. C. Hayes, P. O. Hayne, M. J. Malaska, A. L. Gall, A. Solomonidou and A. Lucas, Compositional and spatial variations in Titan dune and interdune regions from Cassini VIMS and RADAR, *Icarus*, vol. 270, pp. 222–237, **2016**.
30. P. Pontatti, Evolution, origin of life, concepts and methods, Springer, **2019**.
31. Y. Oba, Y. Takano, H. Naraoka, N. Watanabe and A. Kouchi, Nucleobase synthesis in interstellar ices, *Nat. Commun.*, pp. 8–15, **2019**.
32. J. Seckbach, Genesis - In the beginning, *Cellular origins, life in extreme habitats and astrobiology*, Springer.
33. A. I. Oparin, H. Abreu, S. Tirard, A. F. Amaral, J. A. L. da Silva, J. M. Torres, A. L. Araujo, M. Cachão, T. Rodrigues, L. Pereira, F. Carrapiço, R. J. Agostinho and G. V. Levin, Vida - Origem e evolução, Esfera das Ciências, Lisboa, p. 245, **2011**.
34. A. Lazcano and S. L. Miller, The origin and early evolution of life: Prebiotic chemistry, the pre-RNA World, and time, *Cell*, vol. 85, no. 6, pp. 793 – 798, **1996**.
35. E. Camprubí, J. W. de Leeuw, C. H. House, F. Raulin, M. J. Russel, A. Spang, M. R. Tirumalai and F. Westall, The emergence of life on Earth, *Ocean Worlds*, vol. 56, **2019**.
36. R. Gomes, H. F. Levison, K. Tsiganis and A. Morbidelli, Origin of the cataclysmic Late Heavy Bombardment period of the terrestrial planets, *Nature*, vol. 435, no. 7041, pp. 466 – 469, **2005**.
37. O. Abramov and S. J. Mojzsis, Microbial habitability of the Hadean Earth during the Late Heavy Bombardment, *Nature*, vol. 459, no. 7245, pp. 419–422, **2009**.
38. P. M. Perrigue, V. A. Erdmann and J. Barciszewski, Alexander Rich: In Memoriam, *Trends Biochem. Sci.*, vol. 40, no. 11, pp. 623–624, **2015**.

39. G. Walter, Origin of life: The RNA World, *Nature*, p. 86, **1986**.
40. H. S. Bernhardt, The RNA World hypothesis: the worst theory of the early evolution of life (except for all the others), *Biol. Direct*, vol. 7, pp. 1 – 10, **2012**.
41. M. Neveu, H. J. Kim and S. A. Benner, The “strong” RNA World hypothesis: fifty years old., *Astrobiology*, vol. 13, no. 4, pp. 391 – 403, **2013**.
42. L. Antonio, The RNA World and the origin of life : A short history of a tidy, *BIO Web Conf.* 4, vol. 00013, **2015**.
43. Z. Martins, O. Botta, M. L. Fogel, M. A. Sephton, D. P. Glavin, J. S. Watson, J. P. Dworkin, A. W. Schwartz and P. Ehrenfreund, Extraterrestrial nucleobases in the Murchison meteorite, *Earth Planet. Sci. Lett.*, vol. 270, no. 1 – 2, pp. 130 – 136, **2008**.
44. S. A. Sandford, P. P. Bera, T. J. Lee, C. K. Materese and M. Nuevo, Photosynthesis and photo-stability of nucleic acids in prebiotic extraterrestrial environments. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, **2014**.
45. F. Cataldo, Radiolysis and radoracemization of RNA ribonucleosides: implications for the origins of life, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 318, no. 3, pp. 1649 – 1661, **2018**.
46. A. P. Oliveira Lima, Dogma central da biologia molecular. [Online]. Available: <https://www.infoescola.com/biologia/dogma-central-da-biologia-molecular/>. [Accessed: 23-Jul-2019].
47. DNA: resumo, função, estrutura, composição, DNA x RNA. [Online]. Available: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/dna.htm>. [Accessed: 30-Jul-2019].
48. BiologiaGeologia10: Constituintes básicos, **2014**. [Online]. Available: <http://biogeo10c.blogspot.com/2014/03/constituintes-basicos-2.html>. [Accessed: 30-Jul-2019].
49. T. R. Cech, The efficiency and versatility of catalytic RNA: implications for an RNA World, *Gene*, vol. 135, no. 1–2, pp. 33–36, **1993**.
50. What Is the RNA World hypothesis?, **2017**. [Online]. Available: <https://www.forbes.com/sites/quora/2017/05/09/what-is-the-rna-world-hypothesis/#c566c423ac34>. [Accessed: 08-Jul-2019].
51. T. R. Cech, A model for the RNA-catalyzed replication of RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 12, pp. 4360–4363, **1986**.
52. Exploring life’s origins: The discovery of ribozymes; The RNA World hypothesis. [Online]. Available: <http://exploringorigins.org/ribozymes.html>. [Accessed: 08-Jul-2019].
53. S. Clancy, Chemical structure of RNA, *Nature Education*, **2008**. [Online]. Available: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/chemical-structure-of-rna-348>. [Accessed: 08-Jul-2019].
54. O. E. Leslie, Prebiotic chemistry and the origin of the RNA World, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 39, no. 2, pp. 99 – 123, **2004**.
55. Y. Furukawa, H. J. Kim, D. Hutter and S. A. Benner, Abiotic regioselective phosphorylation of adenosine with borate in formamide, *Astrobiology*, vol. 15, no. 4, pp. 259–267, **2015**.
56. M. A. Pasek, Thermodynamics of prebiotic phosphorylation, *Chem. Rev.*, **2019**.
57. A. W. Schwartz, Phosphorus in prebiotic chemistry, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 361,

- no. 1474, pp. 1743 – 1749, **2006**.
58. D-Ribofuranose, *U.S National Library of Medicine*. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5779>. [Accessed: 23-Jul-2019].
 59. Nucleic acid. [Online]. Available: <https://dlc.dcccd.edu/biology1-3/nucleic-acid>. [Accessed: 08-Jul-2019].
 60. A. Butlerow, Formation synthétique d'une substance sucrée, *Compt. Rend. Acad. Sci*, vol. 53, pp. 145 – 147, **1861**.
 61. A. F. Amaral, M. M. Marques, J. A. L. da Silva and J. J. R. Fraústo da Silva, Interactions of D-ribose with polyatomic anions, and alkaline and alkaline-earth cations: Possible clues to environmental synthesis conditions in the pre-RNA World, *New J. Chem.*, vol. 32, no. 11, pp. 2043 – 2049, **2008**.
 62. H. Hu, J. Xue, X. Wen, W. Li, C. Zhang, L. Yang, Y. Xu, G. Zhao, X. Bu, K. Liu, J. Chen and J. Wu, Sugar-metal ion interactions: The complicated coordination structures of cesium ion with D-ribose and myo-inositol, *Inorg. Chem.*, vol. 52, no. 22, pp. 13132 – 13145, **2013**.
 63. Y. Furukawa and T. Kakegawa, Borate and the origin of RNA: A model for the precursors to life, *Elements*, vol. 13, no. 4, pp. 261 – 265, **2017**.
 64. Y. Lu, G. Deng, F. Miao and Z. Li, Sugar complexation with calcium ion. Crystal structure and FT-IR study of a hydrated calcium chloride complex of D-ribose, *J. Inorg. Biochem.*, vol. 96, no. 4, pp. 487 – 492, **2003**.
 65. Y. Lu and J. Guo, Metal-ion interactions with sugars. Crystal structure and FT-IR study of PrCl₃-D-ribose complex, *Carbohydr. Res.*, vol. 341, no. 5, pp. 683–687, **2006**.
 66. Y. Lu, G. Deng, F. Miao and Z. Li, Metal-ion interactions with sugars. Crystal structures and FT-IR studies of the LaCl₃-ribopyranose and CeCl₃-ribopyranose complexes, *Carbohydr. Res.*, vol. 339, no. 10, pp. 1689 – 1696, **2004**.
 67. J. Guo and Y. Lu, Metal ion interactions with sugars: Crystal structure and FT-IR study of the EuCl₃-ribose complex, *J. Carbohydr. Chem.*, vol. 29, no. 1, pp. 10 – 19, **2010**.
 68. J. Guo and Y. Lu, Metal ion interactions with sugars: Crystal structure and FT-IR study of the NdCl₃-ribose complex, *J. Carbohydr. Chem.*, vol. 29, no. 1, pp. 10 – 19, **2010**.
 69. What is the difference between purines and pyrimidines?, **2016**. [Online]. Available: <https://www.albert.io/blog/what-is-the-difference-between-purines-and-pyrimidines/>. [Accessed: 08-Jul-2019].
 70. R. Shapiro, Chemistry of guanine and its biologically significant derivatives, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, vol. 8, no. C, pp. 73 – 112, **1968**.
 71. T. Darvishzad, T. Lubera and S. S. Kurek, Puzzling aqueous solubility of guanine obscured by the formation of nanoparticles, *J. Phys. Chem. B*, vol. 122, no. 30, pp. 7497 – 7502, **2018**.
 72. D. Gur, Y. Politi, B. Sivan, P. Fratzl, S. Weiner and L. Addadi, Guanine-based photonic crystals in fish scales form from an amorphous precursor, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 52, no. 1, pp. 388 – 391, **2013**.
 73. G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes and D. M. Williams, Eds., Nucleic acids in chemistry and biology, The Royal Society of Chemistry, pp. xxxi, 470, **2006**.

74. ¹H NMR spectra of guanosine (A) and its HPLC-purified chlorinated, **2001**. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/1-H-NMR-spectra-of-guanosine-A-and-its-HPLC-purified-chlorinated-adduct-B-The_fig2_11813307. [Accessed: 17-Jul-2019].
75. D. V. Jarikote, Solid phase synthesis of thiazole orange labeled peptide nucleic acids for homogeneous detection of single base mutations in DNA, **2007**. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Watson-Crick-base-pairings-between-the-complementary-nucleobases-adenine-thymine-left_fig2_279829270. [Accessed: 08-Jul-2019].
76. Guanosine, *U.S National Library of Medicine*. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Guanosine#section=Solubility>. [Accessed: 24-Sep-2019].
77. Guanine, *DrugBank*. [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB02377>. [Accessed: 24-Sep-2019].
78. J. Oró, Synthesis of adenine from ammonium cyanide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 2, no. 6, pp. 407 – 412, **1960**.
79. J. Oró, Mechanism of synthesis of adenine from hydrogen cyanide under possible primitive Earth conditions, *Nature*, vol. 191, **1961**.
80. J. Oró and A. P. Kimball, Synthesis of purines under possible primitive Earth conditions. I. Adenine from hydrogen cyanide, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 94, no. 2, pp. 217 – 227, **1961**.
81. M. P. Robertson and S. L. Miller, An efficient prebiotic synthesis of cytosine and uracil, *Nature*, vol. 375, no. 6534, pp. 772 – 774, **1995**.
82. K. E. Nelson, M. P. Robertson, M. Levy and S. L. Miller, Concentration by evaporation and the prebiotic synthesis of cytosine, *Orig. Life Evol. Biosph.*, vol. 31, no. 3, pp. 275 – 278, **2001**.
83. K. Ogawa, M. Kumihashi, K. Tomita and S. Shirotake, The structure of the cytosine–calcium chloride (1:1) complex. The first evidence for direct binding of calcium to cytosine base, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, vol. 36, no. 8, pp. 1793 – 1797, **1980**.
84. N. Marino, D. Armentano, C. Zanchini and G. De Munno, Ca²⁺ metal ion adducts with cytosine, cytidine and cytidine 5'-monophosphate: A comprehensive study of calcium reactivity towards building units of nucleic acids, *CrystEngComm*, vol. 16, no. 35, pp. 8286–8296, **2014**.
85. J. Foriel, P. Philippot, P. Rey, A. Somogyi, D. Banks and B. Ménez, Biological control of Cl/Br and low sulfate concentration in a 3.5-Gyr-old seawater from North Pole, Western Australia, *Earth Planet. Sci. Lett.*, vol. 228, no. 3 – 4, pp. 451 – 463, **2004**.
86. S. E. Kesler and H. Ohmoto, Evolution of early Earth's atmosphere, hydrosphere and biosphere - constraints from ore deposits, *The Geological Society of America*, **2006**.
87. Carbonates, **2019**. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Inorganic_Chemistry\)/Descriptive_Chemistry/Main_Group_Reactions/Compounds/Carbonates](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Inorganic_Chemistry)/Descriptive_Chemistry/Main_Group_Reactions/Compounds/Carbonates). [Accessed: 13-Jul-2019].
88. Reactions of main group elements with carbonates, **2019**. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Inorganic_Chemistry\)/Descriptive_Chemistry/Main_Group_Reactions/Reactions_of_Main_Group_Elem](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Inorganic_Chemistry)/Descriptive_Chemistry/Main_Group_Reactions/Reactions_of_Main_Group_Elem)

- ents_with_Carbonates. [Accessed: 13-Jul-2019].
89. M. Telus, C. M. O. D. Alexander, E. H. Hauri and J. Wang, Calcite and dolomite formation in the CM parent body: Insight from in situ C and O isotope analyses, *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 260, pp. 275 – 291, **2019**.
 90. The Solubility of the hydroxides, sulfates and carbonates. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Inorganic_Chemistry\)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/1_s-Block_Elements/Group__2_Elements%3A_The_Alkaline_Earth_Metals/1Group_2%3A_Chemical_Reactions_of_Al](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Inorganic_Chemistry)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/1_s-Block_Elements/Group__2_Elements%3A_The_Alkaline_Earth_Metals/1Group_2%3A_Chemical_Reactions_of_Al). [Accessed: 13-Jul-2019].
 91. Calcium Sulfate. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Inorganic_Chemistry\)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/1_s-Block_Elements/Group__2_Elements%3A_The_Alkaline_Earth_Metals/Z%3D020_Chemistry_of_Calcium_\(Z%3D20\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Inorganic_Chemistry)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/1_s-Block_Elements/Group__2_Elements%3A_The_Alkaline_Earth_Metals/Z%3D020_Chemistry_of_Calcium_(Z%3D20)). [Accessed: 13-Jul-2019].
 92. Magnesium Sulfate. [Online]. Available: https://chem.libretexts.org/Under_Construction/Walker/Chemicals/Substance%3AM/Magnesium_sulfate. [Accessed: 13-Jul-2019].
 93. Chlorine - Element information, properties and uses | Periodic Table, *Royal Society of Chemistry*, **2019**. [Online]. Available: <http://www.rsc.org/periodic-table/element/17/chlorine>. [Accessed: 14-Jul-2019].
 94. Chloride, **2019**. [Online]. Available: https://chem.libretexts.org/Under_Construction/Walker/Chemicals/Substance_C/Chloride. [Accessed: 14-Jul-2019].
 95. Calcium chloride, **2019**. [Online]. Available: https://chem.libretexts.org/Under_Construction/Walker/Chemicals/Substance_C/Calcium_chloride. [Accessed: 14-Jul-2019].
 96. Magnesium chloride, **2019**. [Online]. Available: https://chem.libretexts.org/Under_Construction/Walker/Chemicals/Substance%3AM/Magnesium_chloride. [Accessed: 14-Jul-2019].
 97. Phosphate. [Online]. Available: <https://www.newworldencyclopedia.org/entry/Phosphate>. [Accessed: 14-Jul-2019].
 98. A. M. Helmenstine, Phosphorylation and how it works, **2019**. [Online]. Available: <https://www.thoughtco.com/phosphorylation-definition-4140732>. [Accessed: 14-Jul-2019].
 99. R. Lohrmann and L. E. Orgel, Urea-Inorganic phosphate mixtures as prebiotic phosphorylating agents, *Science*, vol. 171, pp. 490 – 494, **1968**.
 100. O. V. Zav'yalova, S. Truszkowski, K. Misiura and A. G. Shostenko, Effect of γ -radiation on guanosine, *High Energy Chem.*, vol. 51, no. 4, pp. 315 – 316, **2017**.
 101. A. Carvalho, V. André, A. Franco and J. A. L. da Silva, Resultados não publicados, **2018**.
 102. Magnesium carbonate. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Magnesium_carbonate. [Accessed: 22-Sep-2019].

103. Calcium carbonate, **2018**. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_carbonate. [Accessed: 22-Sep-2019].
104. A. Paz, D. Guadarrama, M. López, J. E. González, N. Brizuela and J. Aragón, A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes, *Quim. Nova*, vol. 35, no. 9, pp. 1724–1727, **2012**.
105. E. F. Greene, S. Tauch, E. Webb and D. Amarasiriwardena, Application of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) for the identification of potential diagenesis and crystallinity changes in teeth, *Microchem. J.*, vol. 76, no. 1 – 2, pp. 141 – 149, **2004**.
106. APEX3 3-0 Bruker-AXS. **2017**.
107. Bruker AXS: SAINT+, release 6.22 Bruker Analytical Systems: Madison, WI. **2014**.
108. Bruker AXS:SADABS. Bruker Analytical Systems: Madison, WI. **2014**.
109. G. M. Sheldrick, SHELXT - Integrated Space space-group and crystal determination, *Acta Crystallogr. a-Foundation Adv.*, vol. 71, pp. 3–8, **2015**.
110. G. M. Sheldrick, Crystal structure refinement with SHELXL., *Acta Crystallogr. Sect. C-Structural Chem.*, vol. 71, pp. 3–8, **2015**.
111. L. Farrugia, WinGX and ORTEP for windows: an update., *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 45, **2012**.
112. L. Farrugia, WinGX Suite for Single Crystal Small Molecule Crystallography, *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 32, pp. 837–838, **1999**.
113. A. Franco, J. Ascenso, L. Ilharco and J. A. L. da Silva, Synthesis of ribonucleotides from corresponding ribonucleosides under plausible prebiotic conditions within self-assembled supermolecular structures - **Em submissão**.
114. D. Gur, M. Pierantoni, N.E. Dov, A. Hirsh, Y. Feldman, S. Weiner and L. Addadi, Guanine crystallization in aqueous solutions enables control over crystal size and polymorphism, *Cryst. Growth Des.*, vol. 16, no. 9, pp. 4975–4980, **2016**.
115. Calcium sulfate, **2018**. [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=B6004671&Mask=80>. [Accessed: 27-Mar-2019].
116. IR Spectrum & Chart. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html>. [Accessed: 16-Oct-2019].
117. M. Mathlouthi, A. M. Seuvre and J. L. Koenig, F.T.-I.R. and laser-raman spectra of guanine and guanosine, *Carbohydr. Res.*, vol. 146, no. 1, pp. 15 – 27, **1986**.
118. CCDC. [Online]. Available: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/>. [Accessed: 24-Oct-2019].
119. J. Maixner and J. Zachová, Redetermination of the structure of guanine hydrochloride monohydrate, *Acta Crystallogr. Sect. C*, vol. 47, no. 11, pp. 2474 – 2476, **1991**.
120. J. Iball and H. R. Wilson, The crystal and molecular structure of guanine hydrochloride dihydrate, *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.*, vol. 288, no. 1414, pp. 418 – 439, **1965**.
121. Rede de Bravais. [Online]. Available: https://pt.wikipedia.org/wiki/Rede_de_Bravais. [Accessed: 24-Oct-2019].
122. K. Guille and W. Clegg, Anhydrous guanine: a synchrotron study, **2006**. [Online]. Available: <https://journals.iucr.org/c/issues/2006/08/00/gd3036/>. [Accessed: 30-Oct-2019].

123. A. Gedanken, Sonochemistry and its application to nanochemistry, *Curr. Sci.*, vol. 85, no. 12, pp. 1720 – 1722, **2003**.
124. Guanine. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Guanine#section=Dissociation-Constants>. [Accessed: 16-Oct-2019].
125. Adenosine, *U.S National Library of Medicine*. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Adenosine#section=Solubility>. [Accessed: 01-Oct-2019].
126. Adenine, *U.S National Library of Medicine*. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Adenine#section=Melting-Point>. [Accessed: 01-Oct-2019].
127. Cytidine, *DrugBank*. [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB02097>. [Accessed: 01-Oct-2019].
128. J. A. Zoltewicz and D. F. Clark, Kinetics and mechanism of the hydrolysis of guanosine and 7-methylguanosine nucleosides in perchloric acid, *J. Org. Chem.*, vol. 37, no. 8, pp. 1193 - 1197, **1972**.
129. H. T. Miles, F. B. Howard and J. Frazier, Tautomerism and protonation of guanosine, *Science*, vol. 142, no. 3598, pp. 1458 – 1463, **1963**.
130. Adenosine Hydrochloride. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Adenosine-hydrochloride>. [Accessed: 17-Oct-2019].
131. K. Shikata, T. Ueki and T. Mitsui, The crystal and molecular structure of adenosine hydrochloride, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, vol. 29, no. 1, pp. 31 - 38, **1973**.
132. P. Kumar, M. K. Cabaj, A. Pazio and P. Dominiak, Protonated nucleobases are not fully ionized in their chloride salt crystals and form metastable base pairs further stabilized by the surrounding anions, *Int. Union Crystallogr.*, vol. 5, pp. 449 – 469, **2018**.
133. Cytidine hydrochloride. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cytidine-hydrochloride>. [Accessed: 17-Oct-2019].
134. Hydroxyapatite, *U.S National Library of Medicine*. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxyapatite#section=Color-Form>. [Accessed: 04-Oct-2019].
135. A. W. Schwartz, Prebiotic phosphorylation-nucleotide synthesis with apatite, *Biochim. Biophys. Acta*, no. 1, pp. 477 – 480, **1972**.
136. J. P. Ferris, R. A. Sanchez and L. E. Orgel, Studies in prebiotic synthesis. III. Synthesis of pyrimidines from cyanoacetylene and cyanate, *J. Mol. Biol.*, vol. 33, no. 3, pp. 693 – 704, **1968**.
137. Calcium Sulfate. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcium-sulfate#section=Melting-Point>. [Accessed: 18-Oct-2019].
138. J. L. Ravanat, T. Douki and M. F. Incardona, HPLC separations of normal and modified nucleobases and nucleosides on an amino silica gel column, *J. Liq. Chromatogr.*, vol. 16, no.

- 15, pp. 3185 – 3202, **1993**.
139. A. Werner, Analysis of nucleotides, nucleosides, nucleobases in cells by ion-pair reversed-phase HPLC, *Chromatographia*, vol. 31, no. 7 – 8, pp. 401 – 410, **1991**.
140. M. . Robins, R. Zou, F. Hansske, D. Madej and D. L. J. Tyrrell, Synthesis, transformation chemistry, and biological activity of guanine nucleosides and analogues, *Nucleosides and Nucleotides*, vol. 8, no. 5 – 6, pp. 725 – 741, **1989**.
141. R. Gupta, S. K. Gupta and D. D. Pathak, Selective adsorption of toxic heavy metal ions using guanine-functionalized mesoporous silica [SBA-16-g] from aqueous solution, *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 288, no. June, p. 109577, **2019**.
142. R. Gupta, S. Layek and D. D. Pathak, Synthesis and characterization of guanine-functionalized mesoporous silica [SBA-16-G]: a metal-free and recyclable heterogeneous solid base catalyst for synthesis of pyran-annulated heterocyclic compounds, *Res. Chem. Intermed.*, vol. 45, no. 3, pp. 1619 – 1637, **2019**.
143. J. Wang, G. Liu, M. H. Engelhard and Y. Lin, Sensitive Immunoassay of a Biomarker Tumor necrosis Factor- α based on Poly(guanine)-Functionalized Silica Nanoparticle Label, *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 19, pp. 6974 – 6979, **2006**.
144. R. Saladino, M. Barontini, C. Cossetti, E. Di Mauro and C. Crestini, The effects of borate minerals on the synthesis of nucleic acid bases, amino acids and biogenic carboxylic acids from formamide, *Orig. Life Evol. Biosph.*, vol. 41, no. 4, pp. 317 – 330, **2011**.

ANEXOS

Anexo A – Caracterização da hidroxiapatite

A hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, foi caracterizada, após síntese laboratorial, por PXRD e FTIR.

O uso da primeira técnica permitiu confirmar que a hidroxiapatite é um composto amorfo. O difratograma apresenta-se na figura A.1.

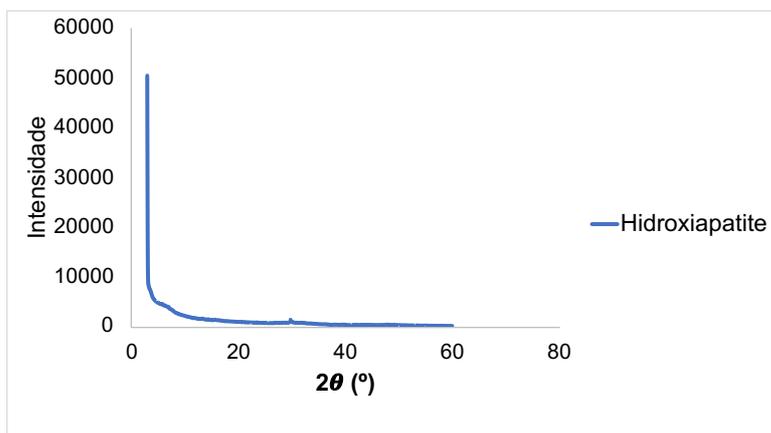


Figura A. 1 – Difratograma da hidroxiapatite

O composto foi, adicionalmente, caracterizado por FTIR. A figura A.2 apresenta o espectro obtido. Neste verificou-se, a $562,26$ e $605,24 \text{ cm}^{-1}$ a presença das bandas correspondentes à vibração assimétrica do grupo fosfato, que, na literatura¹⁰⁵ estão descritas para 563 e 602 cm^{-1} , sendo o desvio verificado pouco significativo. A $1040,54 \text{ cm}^{-1}$ está presente uma banda que poderá ser atribuída à vibração simétrica do mesmo grupo, apesar de na literatura¹⁰⁵ esta ocorrer a 1034 cm^{-1} , o desvio não se considera significativo pois os espectros foram obtidos para resoluções diferentes.

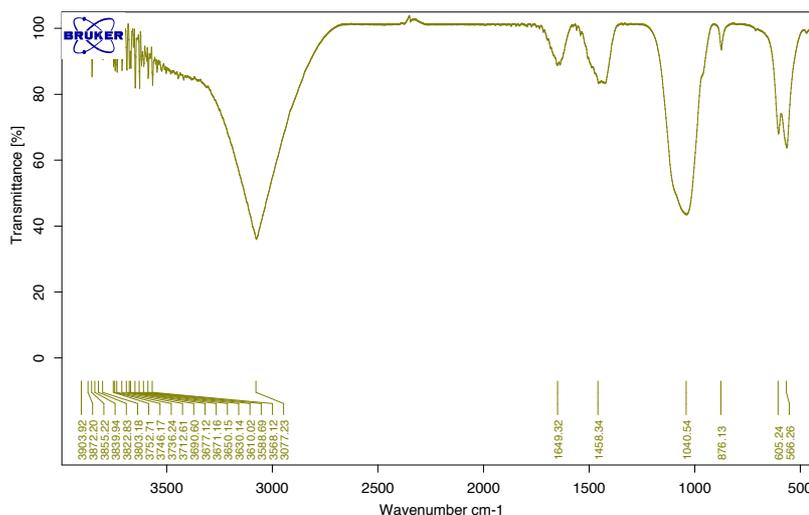


Figura A. 2 – Espectro de FTIR da hidroxiapatite

Ressalve-se, como nota final, que o espectro obtido foi conseguido em transmitância e o utilizado para a comparação apresenta-se em absorvência. A única diferença reside no facto de os mínimos do espectro apresentado corresponderem aos máximos do espectro utilizado para efeitos comparativos, ocorrendo aos mesmos comprimentos de onda.