

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/01/2018.

Dissertação de Mestrado

Pós-Graduação em Física

**IMPLICAÇÕES DA RESILIÊNCIA DE BIOMOLÉCULAS E
EFEITOS DE SUBSTRATO EM AMBIENTES PLANETÁRIOS
SIMULADOS DE ALTA RADIAÇÃO PARA A DETECÇÃO
DE BIOASSINATURAS ESPECTROSCÓPICAS**

TAMIRES MICHELLE GALLO

Rio Claro - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Campus de Rio Claro

TAMIRES MICHELLE GALLO

**IMPLICAÇÕES DA RESILIÊNCIA DE BIOMOLÉCULAS E
EFEITOS DE SUBSTRATO EM AMBIENTES PLANETÁRIOS
SIMULADOS DE ALTA RADIAÇÃO PARA A DETECÇÃO DE
BIOASSINATURAS ESPECTROSCÓPICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas do Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Simões de Vicente
Coorientador: Dr. Douglas Galante

Rio Claro - SP
2016

530 Gallo, Tamires Michelle
G172i Implicações da resiliência de biomoléculas e efeitos de substrato em ambientes planetários simulados de alta radiação para a detecção de bioassinaturas espectroscópicas / Tamires Michelle Gallo. - Rio Claro, 2016
58 f. : il., figs., gráfs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Orientador: Fábio Simões de Vicente
Coorientador: Douglas Galante

1. Física. 2. Espectroscopia Raman. 3. Pigmento carotenoide. 4. Simulações ambientais. 5. Astrobiologia. I. Título.

TAMIRES MICHELLE GALLO

**IMPLICAÇÕES DA RESILIÊNCIA DE BIOMOLÉCULAS E
EFEITOS DE SUBSTRATO EM AMBIENTES PLANETÁRIOS
SIMULADOS DE ALTA RADIAÇÃO PARA A DETECÇÃO DE
BIOASSINATURAS ESPECTROSCÓPICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas do Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fabio Rodrigues
Prof. Dr. Alexandre Mesquita
Prof. Dr. Fábio Simões de Vicente

Rio Claro - SP, 27 de Julho de 2016

Às três pessoas extremamente importantes
para minha formação acadêmica e pessoal:
Tio Sylvio (*in memoriam*) por todo apoio, e
ao Doug e Fabio que me ensinaram a ver a
vida e a ciência de um jeito diferente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Douglas e Fabio, por todo o aprendizado e contribuição de forma inestimável para minha formação, tanto acadêmica como pessoal, pelo convívio, apoio, paciência, compreensão e amizade.

Ao professor Dr. Fábio S. de Vicente da Unesp-Rio Claro por aceitar ser meu orientador nesse projeto.

Aos professores Dr. Edson Denis Leonel e Dr. Fábio S. de Vicente da Unesp- Rio Claro, por toda ajuda desde minha entrada no mestrado.

Agradeço imensamente a todos meus queridos amigos que me ajudaram e apoiaram durante os momentos mais difíceis desse trabalho: À Letícia pelas longas conversas nas noites de desespero, e alegrias. Ao Adriano, Doug, Fabio, Fred, Junior, Lara, Chico, Camili, Horácio e Dimitri por alegrarem meu dia-a-dia. Ao Gabriel pela paciência e seletas de legumes nas noites do AstroLab. Ao Fabio, Doug, Verônica, Gabriel, Lara, Fer, Junior e Dimitri pelas noites de medidas na TGM. À Evelyn e Liza pelas contribuições nas áreas de paleontologia e geologia. Ao Túlio pela compreensão em minhas tentativas de equilibrar o trabalho e o estudo. Ao Fernando e Edu pelas ajudas na informática. À toda equipe de todos os laboratórios que utilizei para a realização desse trabalho. E toda minha família, principalmente à minha mãe que sempre acreditou em mim e esteve presente nos momentos difíceis me dando esperança.

Agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro na primeira parte desse trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Astrobiologia (NAP) pela oportunidade de conhecer pessoas incríveis, e de uso de suas instalações de pesquisa.

Ao Laboratório de Astrobiologia da USP (AstroLab) por disponibilizar a câmara de simulação ambiental, microRaman e o laboratório de microbiologia para o cultivo das bactérias.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pela utilização da linha de luz TGM e o Laboratório de Química.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) pelas medidas da pastilha de *Deinococcus radiodurans* no SEM FEI-Quanta feitas pelo Dr. Douglas Galante.

Ao Laboratório de Biociências (LNBio) pela utilização das instalações de microbiologia, em especial pela ajuda do Fábio A. Neves na preparação do cultivo das bactérias.

À professora Dr. Marcia Rizzutto e a Dr. Paula R. P. Allegro do Instituto de Física da USP, pela disponibilidade do Raman 532 nm portátil.

Ao Laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da USP (LEM – IQ/USP), pelas medidas de reflectância difusa em bancada, feitas com apoio de Evandro Pereira da Silva do Instituto de Química da USP pelas medidas de reflectância de bancada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Contexto em que o trabalho está inserido	1
1.2 Objetivos	3
1.3 Sistema-modelo	4
1.4 Simulações ambientais.....	5
1.5 Técnicas espectroscópicas.....	5
1.5.1 Espectroscopia Raman	5
1.5.2 Espectroscopia de absorção óptica UV-Vis.....	6
2 MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1 Preparação das amostras	8
2.2 Exposição aos ambientes simulados.....	11
2.2.1 Simulador Solar UV ambiental	11
2.2.2 Câmara de simulação planetária e espacial - AstroCam	13
2.2.3 Linha de luz TGM.....	14
2.3 Análises espectroscópicas	16
2.3.1 Espectroscopia Raman	16
2.3.2 Refletância difusa com esfera integradora em bancada.....	17
2.3.3 Refletância difusa <i>in situ</i> na linha de luz TGM.....	18
2.4 Tratamento dos dados.....	18
2.4.1 Espectroscopia Raman	18
2.4.2 Espectroscopia UV-Vis	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
3.1 Medidas Raman dos substratos e <i>D. radiodurans</i>	21
3.2 Medidas Raman dos ambientes simulados	24
3.2.1 Simulação UV ambiental.....	24

3.2.2 Simulação na câmara planetária e espacial - AstroCam	29
3.3 Medidas de reflectância difusa com esfera integradora dos substratos e <i>D. radiodurans</i>	32
3.4 Medidas de reflectância difusa <i>in situ</i> na linha TGM.....	35
3.5 Simulação de UV espacial na linha TGM.....	38
4 CONCLUSÕES.....	40
REFERENCIAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Deinoxantina, variação de carotenoide extraída e isolada da bactéria poli-resistente <i>Deinococcus radiodurans</i>	3
Figura 2 – Tetrâmero de <i>Deinococcus radiodurans</i> visualizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).	4
Figura 3 – Representação de um espectro Raman demonstrando os possíveis espalhamentos Anti-Stokes, Rayleigh e Stokes.	6
Figura 4 – Processo crescimento, lavagem e liofilização da <i>Deinococcus radiodurans</i> . (A) Cultivo do inóculo da bactéria em meio TGY, sob agitação de 200rpm à temperatura de 32°C. (B) Sedimentação da cultura de bactérias após cultivo. (C) Separação do meio de cultura com as bactérias em tubos de centrífuga. (D) Tubos da imagem (C) na centrífuga após serem lavadas 3 vezes por água destilada. (E) Pellet das bactérias após centrifugação. (F) Cultura lavada mantida refrigerada. (G) Liofilizador.	9
Figura 5 – Preparação das misturas e pastilhas. (A) <i>D. radiodurans</i> em pó, após serem lavadas e liofilizadas. (B) Preparação das misturas físicas entre as bactérias, substratos e o pó de diamante. (C) Prensa utilizada para a preparação das pastilhas. (D) Pastilhas das misturas e bactéria com pó de diamante.	10
Figura 6 – Micrografias eletrônicas realizadas no FEI Quanta (LNNano) da pastilha com a mistura com 97% de <i>Deinococcus radiodurans</i> , e 3% de pó diamante. Em (A), com magnificação de ca. 50.000X, pode-se observar as células inteiras, e em (B) com menor magnificação, ca. 200X, observa-se que a amostra apresenta uma distribuição razoavelmente homogênea.	11
Figura 7 – Desenho esquemático (A) e foto (B) do Simulador Solar Oriel (SOL-UV 2).	12
Figura 8 – Espectro de emissão do Simulador Solar Oriel (SOL -UV), que apresenta uma faixa de emissão de 280 a 400 nm, com emissão centrada em 350 nm.	12
Figura 9 – Câmara de Simulação Ambiental – AstroCam.	13
Figura 10 – Comparação das formas espectrais e intensidades do Sol na superfície de Marte e a emitida pelo simulador solar dentro da AstroCam.	14
Figura 11 – Em (A) foto do porta-amostras com pastilhas de alguns padrões testes para a reflectância difusa <i>in situ</i> , e duas pastilhas de <i>D. radiodurans</i> . (B) o esquema da montagem da câmara padrão para o experimento. O feixe branco incidente na amostra não é monocromatizado, sendo o feixe síncrotron da saída do dipolo D05 do LNLS após passar pelos elementos ópticos da linha de luz TGM.	15
Figura 12 – Comparação entre o fluxo solar no espaço e o da linha TGM em feixe branco, na região de ultravioleta de vácuo (Abrevaya.; 2011).	15
Figura 13 – Mapa obtido pelo espectrofotômetro Raman de bancada das pastilhas com a mistura da bactéria com CaCO ₃ (A) e FeO(OH) (B), em vermelho é a intensidade da banda em ca. 1513 cm ⁻¹ e em verde é o sinal de fundo do espectro (background).	16

Figura 14 – Espectro Raman com o laser 785 nm após realização das médias dos espectros obtidos no mapeamento das pastilhas de bactéria pura e em diferentes substratos, antes de serem irradiadas (<i>D. radiodurans</i> está nomeada como Deira).	17
Figura 15 – Imagens geradas pelo software MatLab-2001a® de um dos espectros gerados pelo Raman 785 nm da mistura da bactéria com SiO ₂ antes de ser irradiada. Em azul temos o espectro e em verde a equação da reta.	19
Figura 16 – Espectros de absorção obtidos na linha TGM variando o tempo de exposição ao feixe branco.	20
Figura 17 – Espectros Raman da bactéria e dos diferentes substratos obtidos com excitação em 785 nm, objetiva 20x e 5 acumulações.	23
Figura 18 – (A) Espectros normalizados das médias das misturas de bactéria com SiO ₂ , obtidos com o Raman portátil em 532 nm, após exposição ao simulador solar UV ambiental. (B) Diminuição da intensidade da banda em ca. 1513 cm ⁻¹ das pastilhas de bactérias após exposição no simulador solar UV ambiental, sendo os espectros medidos com laser 785 nm e com a normalização feita pela banda do diamante em 1333cm ⁻¹	24
Figura 19 – Comparação das intensidades das bandas ca. 1154 cm ⁻¹ , 1513 cm ⁻¹ da <i>D. radiodurans</i> pura e em diferentes substratos após serem irradiadas pelo simulador solar UV ambiental por diferentes tempos de exposição. Medidas realizadas com espectrômetro microRaman de bancada com laser em 785 nm.	26
Figura 20 – Comparação das intensidades das bandas ca. 1154 cm ⁻¹ , 1513 cm ⁻¹ da <i>D. radiodurans</i> pura e em diferentes substratos após serem irradiadas pelo simulador solar UV ambiental em diferentes tempos de exposição, através do espectrômetro Raman portátil com laser em 532 nm.	28
Figura 21 – Comparação das intensidades das bandas ca. 1154 cm ⁻¹ , 1513 cm ⁻¹ da <i>D. radiodurans</i> pura e em diferentes substratos após serem irradiadas na AstroCam, através do espectrômetro Raman de bancada 785 nm.	30
Figura 22 – Comparação das intensidades das bandas ca. 1154 cm ⁻¹ , 1513 cm ⁻¹ da <i>D. radiodurans</i> pura e em diferentes substratos após serem irradiadas na AstroCam, através do espectrômetro Raman portátil 532 nm.	31
Figura 23 – Espectros da reflectância dos diferentes substratos testados, medidos no espectrofotômetro Shimadzu UV-3101PC com a esfera integradora, após serem submetidos à transformada de Kubelka-Munk e convertidos para absorbância.	33
Figura 24 – Espectros da reflectância da <i>D. radiodurans</i> pura e da bactéria misturada com diferentes substratos obtidos através do espectrofotômetro Shimadzu UV-3101PC com a esfera integradora, após serem submetidos à transformada de Kubelka-Munk.	34
Figura 25 – Em (A) espectro de reflectância da <i>Deinococcus radiodurans</i> do banco de dados (Hegde.; 2015), e em (B) a medida da reflectância obtida na linha TGM. Em (C) temos o espectro da absorção da deinoxantina extraída da <i>D. radiodurans</i> (Lemee.; 1997).	35
Figura26 – Espectros de absorbância da <i>Deinococcus radiodurans</i> pura e da mistura da bactéria com os substratos obtidos na linha TGM.	37

Figura 27 – Espectro de absorção obtido na linha de luz TGM por UV-Vis.	38
Figura 28 – Delta de reflectância após exposição da <i>D. radiodurans</i> e misturas em diferentes tempos na linha TGM, normalizados por uma corrente de 200mA.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Comparação do tempo para meia vida do sinal do carotenoide das pastilhas submetidas às condições experimentais da linha TGM.....	40
--	----

RESUMO

Esse trabalho visa avaliar como biomoléculas extraídas de micro-organismos podem ser preservadas no registro geológico, como proposta de bioassinaturas (ou biomarcadores), indicativas de vida presente ou passada. Essas moléculas podem sofrer transformações pelos ciclos geológicos e ação da radiação solar. O pigmento carotenoide proveniente da bactéria poli-extremófila *Deinococcus radiodurans* foi analisado por espectroscopia Raman e reflectância difusa UV-Vis, incluindo misturas com diferentes substratos inorgânicos (FeO(OH), CaCO₃, Al₂O₃, SiO₂, solo simulado de Marte - Mars JSC1). Essas misturas foram expostas a três diferentes condições simuladas: a marciana, através de uma câmara de simulação ambiental (AstroCam), a UV ambiental terrestre, e ao ambiente espacial (VUV) na linha de luz TGM do LNLS. A degradação da biomolécula foi analisada em dois espectrômetros Raman (532 nm portátil e 785 nm de bancada), em um UV-Vis de bancada com uma esfera integradora, e na linha TGM, com sistema *in situ* de reflectância. Com os resultados obtidos concluímos que é possível a detecção, com as técnicas empregadas, dos biomarcadores analisados após exposição a diferentes ambientes, porém com possíveis limitações causadas pelos substratos presentes. Propomos a extrapolação dos resultados para experimentos *in situ* em missões espaciais, como no caso de Marte, para a detecção de bioassinaturas espectroscópicas.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, bioassinaturas, pigmento carotenoide, simulações ambientais, astrobiologia.

ABSTRACT

This work aims to evaluate how organic molecules from the metabolism of microorganisms can be preserved in the geological record, in order to be used as biosignatures (or biomarkers), indicative of past or present life. Such molecules can be transformed in accordance with geological cycles and solar radiation. The carotenoid pigment from the poly-extremophilic bacteria *Deinococcus radiodurans* was analyzed by Raman spectroscopy and diffuse reflectance on the UV-Vis, including mixtures with different inorganic substrates (FeO(OH), CaCO₃, Al₂O₃, SiO₂, simulated Martian soil - Mars JSC1). These mixtures were exposed to three different simulated conditions: Martian, through an environmental simulation chamber (AstroCam), the terrestrial environmental UV, and space environment (VUV) at the TGM beamline of LNLS. The degradation of the biomolecule was analyzed by two Raman spectrometers (portable Raman at 532 nm and bench-top microRaman at 785 nm), bench-top UV-Vis with an integrating sphere, and an *in situ* reflectance system. With the results we concluded that it is possible to detect the proposed biomarkers with the techniques employed, after exposure to different environments, but with possible limitations caused by the present substrates. We propose the extrapolation of the results for *in situ* experiments in space missions, such as in the case of Mars, for detecting spectroscopic biosignatures.

Keywords: Raman spectroscopy, biosignature, carotenoid pigment, environmental simulations, astrobiology.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto em que o trabalho está inserido

O presente trabalho está incluído na área de pesquisa conhecida como astrobiologia, um recente campo de pesquisa no Brasil e no mundo, que busca compreender a vida no Universo - sua origem, evolução, distribuição e futuro - enxergando-a como um fenômeno natural conectado e co-evoluindo com o planeta e o Universo em si.

A procura de vida fora da Terra tem atraído a atenção de muitos grupos de pesquisa, e o investimento neste tipo de estudo tem ganhado cada vez mais força, (Rodrigues *et al.*, 2012) sobretudo com o envio de sondas de pesquisa robotizadas a Marte (Squyres *et al.*, 2005). Estes equipamentos têm permitido o estudo de vários aspectos de rochas aflorantes na superfície marciana (e.g. Squyres *et al.*, 2005; Grotzinger *et al.*, 2005). Os resultados obtidos apontam que Marte, assim como outros planetas e luas apresentaram, ou ainda apresentam, atividade geológica, o que garante uma superfície dinâmica e a existência de diferentes ambientes, com possibilidade de provimento de nutrientes suficientes para suportar vida (Barbieri *et al.*, 2011). Sendo assim, é possível que haja não somente evidências de vida pretérita, ou seja, fósseis (Farmer *et al.*, 1999; Cady *et al.*, 2003; Barbieri *et al.*, 2011), mas talvez até mesmo vida ativa no planeta, talvez em seu subsolo.

A partir do momento que um organismo morre e é soterrado, o material orgânico original tende a se perder, sendo transformado em formas desorganizadas de carbono, ou, em alguns casos, sendo mineralizado. Moléculas orgânicas oriundas do organismo soterrado também podem ser preservadas, às vezes sendo o único resquício de sua existência. Tratam-se dos quimiofósseis, ou seja, biomoléculas que, após soterramento e alterações impostas por diferentes processos geoquímicos, passam a apresentar modificações em sua estrutura, porém ainda reunindo características reliquias da molécula original, suficientes para, em alguns casos, identificar o organismo que a deu origem (Simoneit, 2002). Usualmente, estas moléculas são conhecidas como biomarcadores ou bioassinaturas moleculares.

Quimiofósseis foram identificados em rochas de, pelo menos, 2.7 bilhões de anos, e estão entre as evidências mais antigas da vida na Terra (Brocks *et al.*, 1999; Waldbauer *et al.*, 2009).

Evidências isotópicas mais recentes indicam a presença de atividade biológica na Terra a 4.1 bilhões de anos atrás (Bell *et al.*, 2015).

Quimiofósseis também são de interesse da astrobiologia (Klein *et al.*, 1995; Simoneit, 2002; DesMarais *et al.*, 2008; Parnell *et al.*, 2007), uma vez que as condições de preservação/fossilização em ambientes extraterrestres, a exemplo do que eventualmente acontece no registro terrestre, podem não ter favorecido a preservação do organismo, mas apenas de suas moléculas.

Uma técnica de caracterização muito eficiente para detecção de biomoléculas é a espectroscopia Raman. Essa técnica versátil permite tanto a caracterização da mineralogia do ambiente, como também da fase orgânica, pode ser usada para a detecção de vida microbiana presente ou passada, bem como as condições geoquímicas de seu micro-habitat (Dartnell *et al.*, 2012).

Em 2018, a agência espacial europeia (*European Space Agency* - ESA) irá lançar o módulo de pouso da missão ExoMars para o planeta Marte, a qual irá carregar um espectrômetro Raman 532 nm como parte do conjunto de instrumentos Pasteur, com o qual pretendem analisar a composição mineral do solo e buscar possíveis biomoléculas (Lacoste *et al.*, 2007; Sobron *et al.*, 2014). A sonda Mars2020 da agência espacial norte-americana (*National Aeronautics and Space Administration* - NASA) também deve contar com dois espectrômetros Raman (instrumentos SuperCam e SHERLOC), incluindo com laser no ultravioleta.

Algumas das potenciais biomoléculas que receberão atenção nestas e em futuras missões a Marte serão pigmentos biológicos, mas outras também são propostas (Parnell *et al.*, 2007). Essa lista considerou a univocidade das moléculas como de origem biológica, a resistência às condições extremas ambientais, e facilidade em sua detecção. Em especial, pigmentos tem a propriedade de absorver na região do UV-Vis do espectro eletromagnético, o que pode facilitar sua detecção.

Entre esses pigmentos orgânicos que podem ser encontrados em vários micro-organismos estão os carotenóides. Neste trabalho, serão estudados os carotenóides presentes na bactéria poli-resistente *Deinococcus radiodurans* (Lemee *et al.*, 1997), em especial seu mais abundante, a deinoxantina (Ji.; 2010), que é uma xantofila (Figura 1).

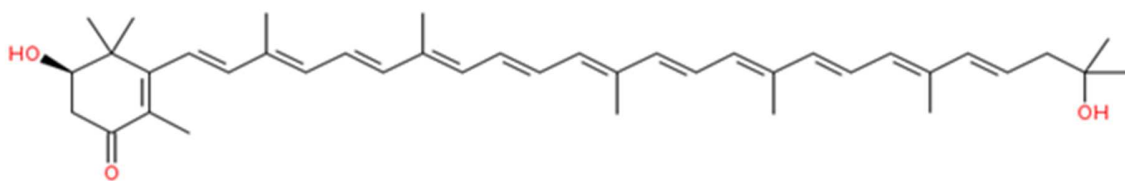


Figura 1 – Deinoxantina, variação de carotenoide extraída e isolada da bactéria poli-resistente *Deinococcus radiodurans*.

Para compreender os processos envolvidos na preservação de biomoléculas testando sua capacidade de permanecer no registro fóssil terrestre e marciano, fizemos um estudo sistemático utilizando espectroscopia Raman e por absorção UV-Vis para analisar as transformações sofridas nos pigmentos presentes na *Deinococcus radiodurans*, misturada em diferentes substratos, após ser submetida a fatores ambientais como radiação e dessecação.

1.2 Objetivos

Os objetivos gerais desse trabalho são de compreender os processos envolvidos na degradação de biomoléculas após exposição aos fatores ambientais simulados utilizando espectroscopia Raman e absorção UV-Vis.

E os objetivos específicos são:

- Cultivo de bactérias *Deinococcus radiodurans*;
- Preparação da massa bacteriana em pastilhas, para uso nos experimentos;
- Desenvolvimento de padrão interno de calibração (pó de diamante);
- Teste das técnicas espectroscópicas com amostras conhecidas;
- Realização das simulações ambientais;
- Detecção e caracterização da resposta espectroscópica da classe de moléculas proposta, para uso com bioassinatura.

1.3 Sistema-modelo

São chamados extremófilos seres vivos capazes de sobreviver em ambientes considerados extremos, ou seja, próximos ao limite físico-químico da estabilidade das biomoléculas, ou apenas muito diferentes do ambiente mesofílico fisiológico. Em sua maioria, são micro-organismos com alta resistência aos parâmetros físicos como radiação, pressão e temperatura, e geoquímicos como salinidade e pH (Paulino *et al.*; 2009).

Utilizamos a bactéria *Deinococcus radiodurans*, figura 2, pois é um organismo poli-extremófilo bem caracterizado, sendo um dos mais resistentes à radiação ionizante já descritos na literatura (Battista *et al.*; 1999; Daly *et al.*; 2009). Essa resistência é conferida por diversos sistemas celulares da bactéria, e, entre eles, agentes antioxidantes, como os carotenoides, que também lhe fornecem sua pigmentação característica. Quando expostos à agentes oxidantes, neutralizam os radicais livres através da quebra de suas duplas ligações, além de ser um pigmento foto-protetor absorvendo a radiação principalmente na região do UVA – violeta no espectro.



Figura 2 – Tetrâmero de *Deinococcus radiodurans* visualizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)¹.

Os carotenoides são sintetizados apenas através de rotas biológicas, ou seja, não há síntese abiótica conhecida para tal tipo de molécula, e seus espectros Raman possuem três bandas mais intensas bem características (ca. 1000, 1155 e 1520 cm^{-1}) (Oliveira *et al.*; 2010). A absorção no visível e as bandas Raman intensas fazem dos carotenóides potenciais bioassinaturas espectroscópicas.

¹ Adaptado de Wikimedia Commons “File:Deinococcus radiodurans.jpg”
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Deinococcus_radiodurans.jpg

1.4 Simulações ambientais

As simulações ambientais foram realizadas em nível crescente de complexidade experimental, tendo iniciado por uma simulação de um ambiente natural onde as bactérias poderiam estar expostas na Terra, utilizando um simulador solar de UV ambiental. O segundo experimento utilizou uma Câmara de Simulação Espacial e Planetária (AstroCam) que se encontra no Núcleo de Pesquisa em Astrobiologia da Universidade de São Paulo (IAG - USP) para simular o ambiente marciano, e por último, foi realizada a simulação das condições de um ambiente espacial desprotegido de qualquer atmosfera, utilizando a linha de luz TGM (*Toroidal Grating Monochromator*) do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron). Após a exposição a esses três ambientes, variando a fluência da exposição à radiação, foi verificada a possibilidade de detecção da biomolécula em estudo.

1.5 Técnicas espectroscópicas

1.5.1 Espectroscopia Raman

O efeito Raman é o resultado do espalhamento inelástico da radiação com a matéria, ou seja, ao interagir, os fótons irão perder energia, espalhamento Stokes ($\Delta E = h\nu$) ou ganhar energia, espalhamento anti-Stokes ($\Delta E = -h\nu$), dependendo dos modos vibracionais que forem excitados e das regras de seleções espectroscópicas envolvidas (figura 3). Os fótons espalhados são coletados e a diferença de energia entre eles e a dos fótons do laser incidente corresponde à frequência de vibração das ligações químicas dos átomos de uma molécula, o que depende de vários fatores, como a distribuição eletrônica (e sua polarizabilidade) e da geometria molecular.

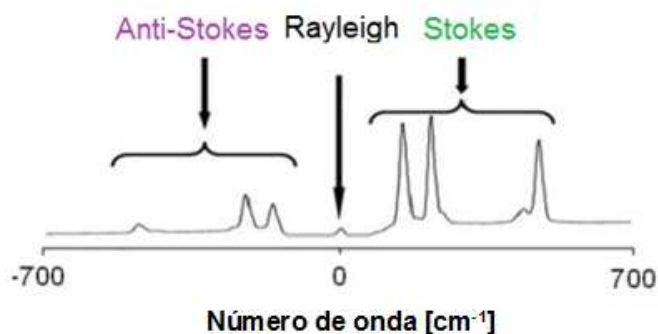


Figura 3 – Representação de um espectro Raman demonstrando os possíveis espalhamentos Anti-Stokes, Rayleigh e Stokes.

Quando a energia incidente coincide com a energia de absorção eletrônica da molécula ocorre o efeito de Raman ressonante, causando uma intensificação do sinal Raman. O efeito Raman ressonante é útil para investigar moléculas como RNA (ácido ribonucleico), DNA (ácido desoxirribonucleico), aminoácidos, proteínas, carotenoides e clorofila. Pois todas as moléculas passam por transições eletrônicas quando excitados no ultravioleta ou visível (Marshall *et al.*, 2010).

A espectroscopia Raman, quando comparada com outras técnicas espectroscópicas (especialmente vibracionais, como espectroscopia no infravermelho), tem algumas vantagens, como a não necessidade de preparo de amostras, o que possibilita medidas *in situ*. Além disso, as medidas são relativamente rápidas e de interpretação direta, além de serem pouco interferidas pela presença de água (Hooijschuur *et al.*, 2013). Alguns de seus pontos negativos são as possíveis interferências de composições orgânicas e minerais que apresentam um grande sinal de fluorescência ou luminescência, o qual pode, em alguns casos, sobrepor as bandas de interesse a serem analisadas. Mesmo assim é uma técnica muito utilizada para análise de amostras ambientais.

1.5.2 Espectroscopia de absorção óptica UV-Vis

A espectroscopia na faixa do ultravioleta e visível permite a medida de estados eletrônicos da amostra de interesse, sejam átomos, moléculas ou cristais, por essas transições terem energias equivalentes aos comprimentos de onda nessa faixa espectral. Por produzirem

absorções na região do visível, esses estados, ou conjuntos de estados geram linhas (ou bandas) de absorção que podem absorver uma parte significativa da luz incidente (se for de espectro contínuo, como a luz solar ou de uma lâmpada de alta pressão), gerando um deslocamento na escala cromática, que, além de produzirem uma distinta percepção cromática (cor), também podem ser usados para sua identificação.

Para as medidas de absorção UV-Vis, diferentes geometrias e equipamentos podem ser empregados. No caso de amostras sólidas ou altamente absorventes, as medidas tradicionais por transmissão se tornam problemáticas, e é típico empregar a técnica de reflectância, seja especular ou difusa.

Na refletância difusa, é medida a luz espalhada de forma isotrópica pelas camadas superficiais de um material, ou seja, a fração da luz incidente é refletida pela superfície do material de forma difusa devido a rugosidade da superfície dos materiais. Para integrar a reflexão difusa é utilizada, em muitos casos, uma esfera integradora espelhada, pois muitos materiais apresentam grãos irregulares com escalas da ordem do comprimento de onda da luz incidente, o que os torna excelentes núcleos espalhadores. A esfera integradora garante que a luz espalhada de maneira quase isotrópica seja coletada e direcionada para o detector. Apesar de importante para garantir um sinal mais intenso, ela não é essencial para a medida em si. Neste trabalho, no caso das medidas realizadas em ultra-alto vácuo, não foi utilizada esfera integradora por dificuldades técnicas. Mesmo assim, foi possível coletar uma parcela suficiente de luz refletida para realizar a medida.

A relação entre absorção da luz com as propriedades do material atravessado por ela é descrita pela Lei de Beer-Lambert, que define a existência de uma relação exponencial entre a transmissão da luz através de uma substância, ou seja, a intensidade da luz emitida decresce exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente, que pode ser descrita pela equação [1];

$$I = I_0 e^{-\alpha L} \quad [1]$$

Onde I e I_0 , são a intensidade do feixe transmitido e incidente em um determinado material, α é o coeficiente de absorção que depende do meio absorvente empregado, e L é a espessura do meio absorvente.

Algumas moléculas, como os pigmentos biológicos, possuem forte absorção na faixa do visível, como os carotenoides. Por apresentarem em sua estrutura uma sequência de duplas ligações carbono-carbono conjugadas, os elétrons adotam uma distribuição delocalizada. Como em uma onda estacionária em uma corda, quanto maior o número de carbonos da molécula, ou maior seu comprimento, menor será a frequência típica para excitação eletrônica, e maior será o comprimento de onda de luz absorvido. Dessa maneira, carotenoides tipicamente absorvem na faixa de 400 a 550 nm, com os de menor tamanho absorvendo em comprimentos de onda menor (ou de maior frequência).

Para transpor as medidas feitas por refletância para absorbância (e, se necessário para absortividade molar), que pode ser relacionada com a densidade de estados eletrônicos, os efeitos geométricos de espalhamento devem ser compensados, o que é feito por diversos modelos, mas é extremamente amostra-dependente. Uma das transformadas mais usadas é a de Kubelka-Munk, que foi adotada nesse trabalho, como será apresentado no item 2.3.1.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação das amostras

Os substratos inorgânicos escolhidos para esse estudo são semelhantes aos da composição de solo terrestre e marciano (Mahaney.; 2007; Cousins.; 2011; Bonin.; 2002) em sua forma pura e argila (SiO_2 , Al_2O_3 , $\text{FeO}(\text{OH})$, CaCO_3 , e o solo comercial simulado de Marte - JSC Mars 1A da Orbitec; contém: SiO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , FeO , MgO , CaO , Na_2O , K_2O , MnO , P_2O_5 ²).

Utilizamos pó de diamante sintético (ca. $1,6\mu\text{m}$ de tamanho de grão), como padrão interno para Raman, pois suas ligações carbono-carbono sp^3 são bem definidas e equivalentes, produzindo uma banda característica (ca. 1333cm^{-1}) em Raman. A banda do espectro de diamante, após testes realizados com diferentes doses de radiação e pressão, mostrou-se sem variação em forma e intensidade, permitindo que ela fosse usada como um bom padrão interno para os experimentos de simulação.

² http://www.orbitec.com/store/JSC_Mars-1A_Material_Safety_Datasheet.pdf

REFERENCIAS

- Barbieri, R.; Stivaletta, N. 2011. Continental evaporites and the search for evidence of life on Mars. *Geological Journal*, 46(6): 513-524.
- Battista, John R, Ashlee M Earl, and Mie-Jung Park. 1999. "Why Is *Deinococcus Radiodurans* so Resistant to Ionizing Radiation?" *Trends in Microbiology* 7 (9): 362–65.
- Bell, E. A., P. Boehnke, T. M. Harrison, and W. L. Mao. 2015. Potentially Biogenic Carbon Preserved in a 4.1 Billion-Year-Old Zircon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Bonin, B., Bébien, J., Masson, P. 2002. Granite: A Planetary Point of View. *Gondwana Research*, 5(2): 261-273.
- Brocks, J.J; Logan, G.A.; Buick, R.; Summons, R.E. 1999. Archean molecular fossils and the Early rise of Eukaryotes. *Science*, 285: 1033-1036.
- Cousins, C.R., Crawford, I.A. 2011. Volcano-ice interaction as a microbial habitat on Earth and Mars. *Astrobiology*, 11(7): 695-711.
- Daly, Michael J. 2009. A New Perspective on Radiation Resistance Based on *Deinococcus Radiodurans*. *Nature Reviews Microbiology* 7 (3): 237–45. doi:10.1038/nrmicro2073.
- Dartnell L.R., Page K., Villar S.J., Wright G., Munshi T., Scowen I., Ward J.M., Edwards H.G.M. 2012. Destruction of Raman biosignatures by ionising radiation and the implications for life-detection on Mars. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(1), 131-144.
- DesMarais, D.J.; Nuth III, J.A.; Allamandola, L.J.; Boss, A.P.; Farmer, J.D.; Hoehler, T.M.; Jakovsky, B.M.; Meadows, V.S.; Pohorille, A.; Runnegar, B.; Spormann, A.M. 2008. The NASA Astrobiology Roadmap. *Astrobiology*, 8(4): 715-730.
- Edwards, H. G. M.; Villar, S. E. J.; Jehlicka, J.; Munshi, T. 2005. FT–Raman spectroscopic study of calcium-rich and magnesium-rich carbonate minerals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61: 2273-2280.
- Gill, D.; Kilponen R. G.; Rimai L. 1970. Resonance Raman Scattering of Laser Radiation by Vibrational Modes of Carotenoid Pigment Molecules in Intact Plant Tissues. *Nature*, 227: 743-744.
- Grotzinger, J.P. e outros 19 autores. 2005. Stratigraphy and sedimentology of a dry to wet eolian depositional system, Burns Formation, Meridiani Planum, Mars. *Earth and Planetary Science Letters*, 240: 11-72.
- Hegdea, S., Paulino, I.G.L., Kentc, R., Kaltenegger L., Rothschild, L. 2015. Surface biosignatures of exo-Earths: Remote detection of extraterrestrial life. *112(3): 3886-3891*.

- Hooijschuur, J.H.; Petterson, I.E.I.; Davies, G.R.; Ariese, C.G.F. 2013. Time resolved Raman spectroscopy for depthanalysis of multi-layered mineral samples. *J. Raman Spectrosc*, 44: 1540–1547.
- Ji, H.F. 2010. Insight into the Strong Antioxidant Activity of Deinoxanthin, a Unique Carotenoid in *Deinococcus Radiodurans*. *Int J. Mol. Science*, 11: 4506–4510.
- Klein, H.P.; Farmer, J.D. 1995. Status of the search for life on Mars. *Progress in the Search for Extraterrestrial Life*, ASP Conference Series, 74: 65–71.
- Lacoste, G.B.C.; Ahlers, B.; Perez, F.R. 2007. Combined Raman spectrometer/laser-induced breakdown spectrometer for the next ESA mission to Mars. *Spectrochimica Acta Part A*, 68: 1023–1028.
- Lemee, L., Peuchant, E., Clerc, M., Brunner, M., Pfander, H. 1997. Deinoxanthin: A new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron*, 53(3): 919–926.
- Loyalka, S.K.; Riggs, C.A. 1995. Inverse Problem in Difusse Reflectance Spectroscopy: Accuracy of the Kubelka-Munk Equations. *Applied Spectroscopy*, 49 (8): 1107–1110.
- Mahaney, W.C.; Miyamoto, H.; Dohm, J.M.; Baker V.R.; Cabrol N.a.; Grin E.A.; Berman D.C. 2007. Rock glaciers on Mars: Earth-based clues to Mars' recent paleoclimatic history. *Planetary and Space Science*, 55(1-2): 181–192.
- Marshall, C.P.; Marshall, A.O. 2010. The potential of Raman spectroscopy for the analysis of diagenetically transformed carotenoids. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 368: 3137–3144.
- Marshall, C.P.; Leuko, S.; Coyle, C. M.; Walter, M. R.; Burns, B. P.; Neilan, B. A. 2007. Carotenoid Analysis of Halophilic Archaea by Resonance Raman Spectroscopy. *Astrobiology*, 7(4): 631–643.
- Molina, G.J.C, Stumptner, W., Lammer, H., Kömle, N.I., O'Brien, K. 2001. Cosmic Ray and UV Radiation Models on the Ancient Martian Surface, *Icarus*, 154(1): 216–222.
- Oliveira, V.E.; Castro, H.V.; Edwards, H.G.M.; Oliveira, F.C. 2010. Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41: 642–650.
- Paulino, I.G.L. Investigações das condições de sobrevivência de microorganismos extremófilos em ambientes extraterrestres simulados. 2010. Tese doutorado (Doutorado em ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.
- Parnell, J. e outros 15 autores. 2007. Searching for life on Mars: selection of molecular targets for ESA's Aurora ExoMars Mission. *Astrobiology*, 7(4): 578–604.

Rodrigues, F., Galante, D., Paulino, I.G.L., Duarte, R., Friaça, A.C.S., Lage, C., Janot, E.P., Teixeira, R., Horvath, J.E., 2012. Astrobiology in Brazil: early history and perspectives. *International Journal of Astrobiology*, 11(4): 189-202.

Simoneit, B.R.T. 2002. Molecular indicators (biomarkers) of past life. *The Anatomical Record*, 268: 186-195.

Squyres, S.W.; Knoll, A.H. 2005. Sedimentary rocks at Meridiani Planum: origin, diagenesis, and implications for life on Mars. *Earth and Planetary Science Letters*, 240: 1-10.

Sobron, P.; Bishop, J.L.; Blake, D.F.; Chen, B.; Perez, F. R. 2014. Natural Fe-bearing oxides and sulfates from the Rio Tinto Mars analog site: Critical assessment of VNIR reflectance spectroscopy, laser Raman spectroscopy, and XRD as mineral identification tools. *American Mineralogist*. 99: 1199–1205.

Waldbauer, J.R.; Sherman, L.S.; Summer, D.Y.; Summons, R.E. 2009. Late Archean molecular fossils from the Transvaal Supergroup record the antiquity of microbial diversity and aerobiosis. *Precambrian Research*, 169: 28-47.

Withnall, R.; Chowdhry, B. Z.; Silver, J; Edwards, H. G. M.; Oliveira, L. F. C. 2003. Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59: 2207-2212.

Verkaaik, M. F.C.; Jan-Hein, H.; Gareth D. R.; Freek, A. 2015. Raman Spectroscopic Techniques for Planetary Exploration: Detecting Microorganisms through Minerals. *Astrobiology*, 15(8): 697-707.

Villar, S. E. J.; Edwards H. G. M. 2006. Raman spectroscopy in astrobiology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384: 100-113.

Vítek, P.; Jehlička, J.; Edwards, H. G. M.; Osterrothová K. 2009. Identification of β -carotene in an evaporitic matrix—evaluation of Raman spectroscopic analysis for astrobiological research on Mars. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393: 1967-1975.