

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
G172i

Gallo, Tamires Michelle

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).

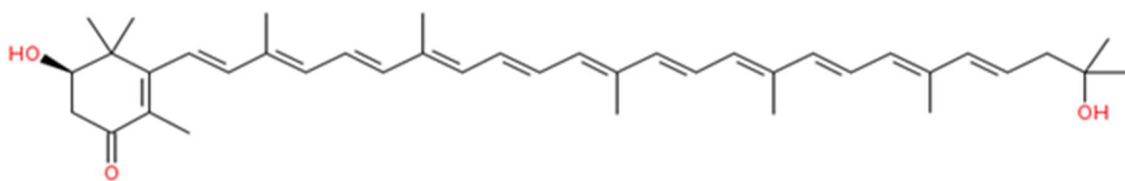


Figura 1 – Deinoxantina, variação de carotenoide extraída e isolada da bactéria poli-resistente *Deinococcus radiodurans*.

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.

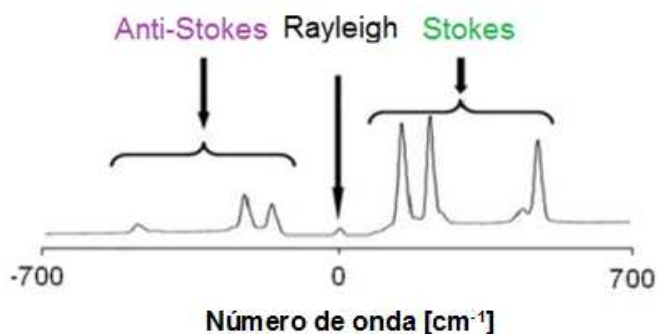


Figura 3 – Representação de um espectro Raman demonstrando os possíveis espalhamentos Anti-Stokes, Rayleigh e Stokes.

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

As culturas de *D. radiodurans*, cedidas pelo Laboratório de Radioproteção e Dosimetria do Rio de Janeiro (IRD/RJ), foram crescidas em meio TGY (Tryptona, Glicose e Levedura) por 48 h à 32 °C com agitação de 200 rpm (Paulino.; 2009). Após crescimento, foram lavadas três vezes com água destilada, centrifugadas por 15 min à 6000 rpm, e secadas em um liofilizador por 12 h (processo ilustrado na figura 4).

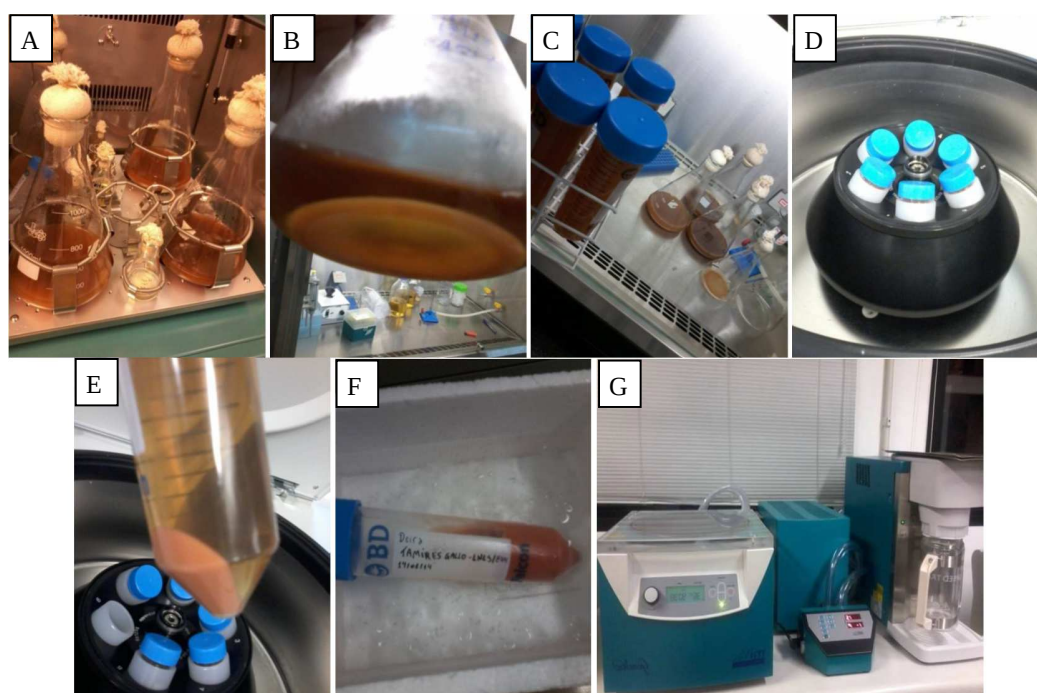


Figura 4 – Processo crescimento, lavagem e liofilização da *Deinococcus radiodurans*. (A) Cultivo do inoculo da bactéria em meio TGY, sob agitação de 200rpm à temperatura de 32°C. (B) Sedimentação da cultura de bactérias após cultivo. (C) Separação do meio de cultura com as bactérias em tubos de centrifugua. (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.

Para maior controle da homogeneidade na mistura dos substratos com a bactéria, ambos foram peneirados. O pó obtido de *D. radiodurans* foi peneirado com filtros de 4.5 µm, e os substratos com filtros de 90 µm. A mistura física dos componentes foi feita na proporção de 3% de pó de diamante, 48.5% de bactérias e 48.5% de substrato, misturadas fisicamente em um almofariz por 10 min. Esses valores foram escolhidos após testes no Raman de bancada com laser 785 nm, para que a intensidade da banda do diamante fosse similar ao das bandas de interesse.

Após esse processo, pastilhas com aproximadamente 25 mg de mistura foram prensadas com 1 t por aproximadamente 5 s, coladas em tiras de folha de Kapton® (filme de poliimida, DuPont®) com fita dupla face de carbono própria para microscopia eletrônica (compatível com vácuo), figuras 4 e 5.



Figura 5 – Preparação das misturas e pastilhas. (A) *D. radiodurans* 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.

Foram realizadas micrografias eletrônicas no microscópio eletrônico de varredura SEM FEI Quanta (Laboratório Nacional de Nanotecnologia- CNPEM/LNNano), para a análise da superfície das pastilhas e verificar sua homogeneidade. Foram observadas, na pastilha composta somente de bactérias e pó de diamante, células morfolologicamente intactas (por inspeção visual), como pode ser visto na figura 6.

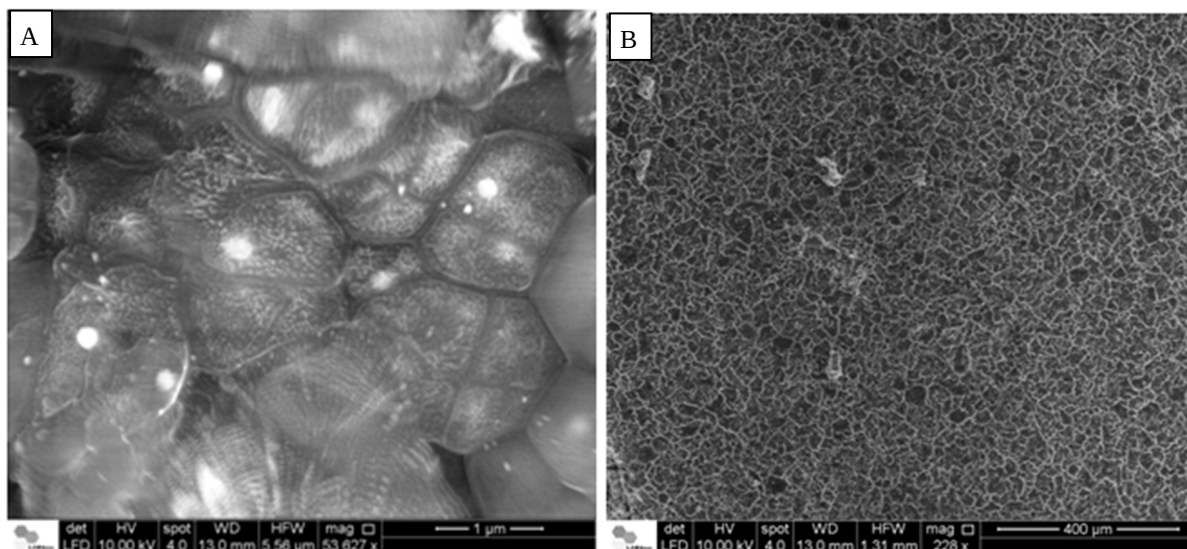


Figura 6 – Micrografias eletrônicas realizadas no FEI Quanta (LNNano) da pastilha com a mistura com 97% de *Deinococcus radiodurans*, e 3% de pó diamante. Em (A), com magnificação de ca. 50.000X, pode-se observar as células inteiras, e em (B) com menor magnificação, ca. 200X, observa-se que a amostra apresenta uma distribuição razoavelmente homogênea.

2.2 Exposição aos ambientes simulados

2.2.1 Simulador Solar UV ambiental

Foi utilizado o Simulador Solar Oriel (SOL-UV 2), figura 07, para expor as pastilhas à radiação UVA e UVB em diferentes faixas de tempo 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 15 h, e 18 h com abertura máxima do obturador (equivalente a cerca de 8X o fluxo solar terrestre), figura 08. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente e expostas à atmosfera.

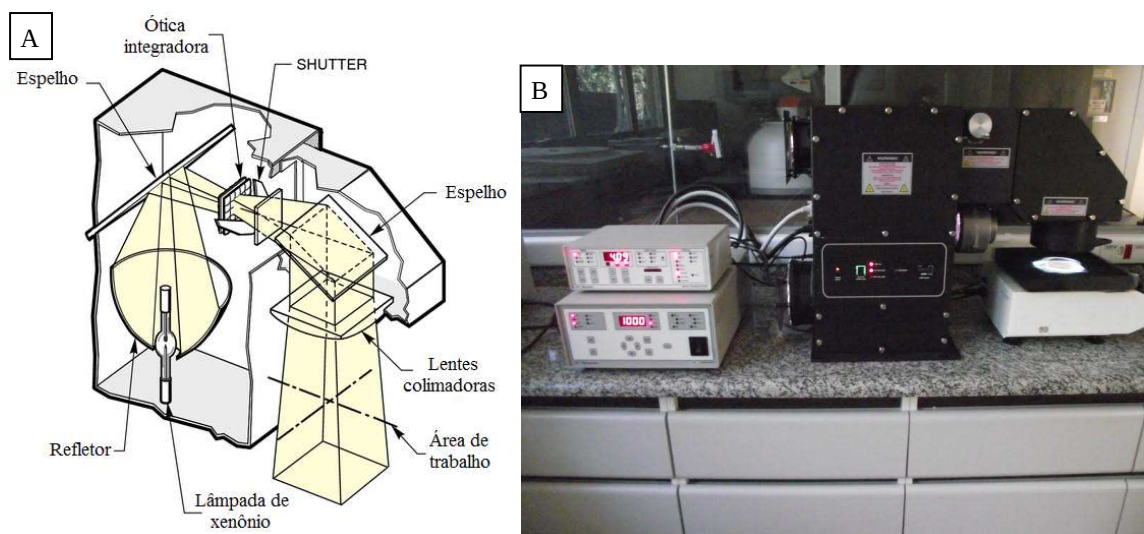


Figura 7 – Desenho esquemático (A) e foto (B) do Simulador Solar Oriel (SOL-UV 2).

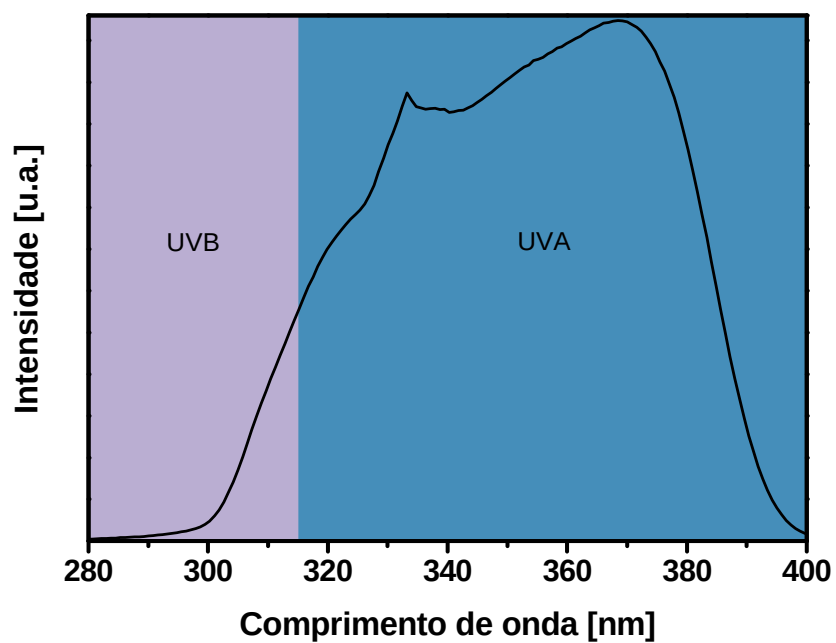


Figura 8 – Espectro de emissão do Simulador Solar Oriel (SOL -UV), que apresenta uma faixa de emissão de 280 a 400 nm, com emissão centrada em 350 nm.

2.2.2 Câmara de simulação planetária e espacial - AstroCam

As doses de radiação UV semelhante ao que se encontra na superfície de Marte foram obtidas na AstroCam, figura 9, através do Simulador Solar Oriel *Full Spectrum* 1000 W, com um filtro AM0 (para fazer o *shaping* para o espectro solar no espaço) e janela de vidro (*fused sílica*, com corte em ca. 200nm) e fluxo integrado de aproximadamente 9000 W/m² na região da amostra, figura 10. As fluências usadas foram de 10 kJ/m², 20 kJ/m², 30 kJ/m², 40 kJ/m², e 60 kJ/m², medidos na faixa do UVC. Na AstroCam, simulamos as condições marcianas com a composição da atmosfera de 95% CO₂ e 5% N₂, e pressão 8 mbar durante a exposição das pastilhas à radiação.

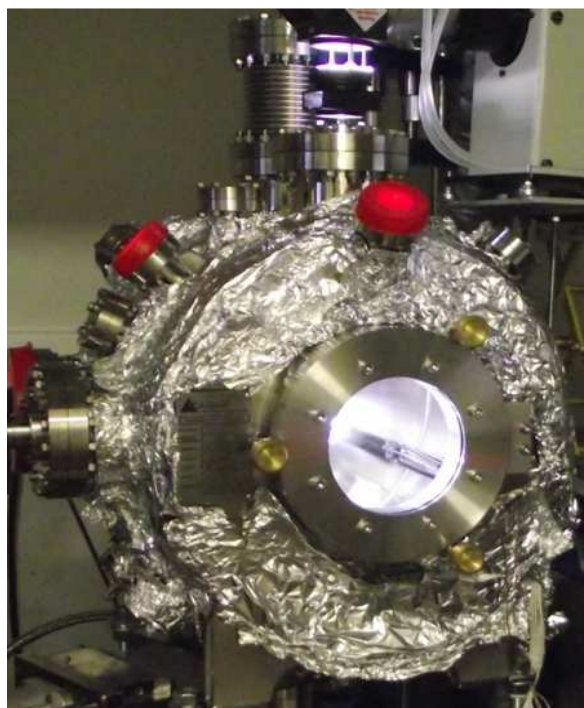


Figura 9 – Câmara de Simulação Ambiental – AstroCam.

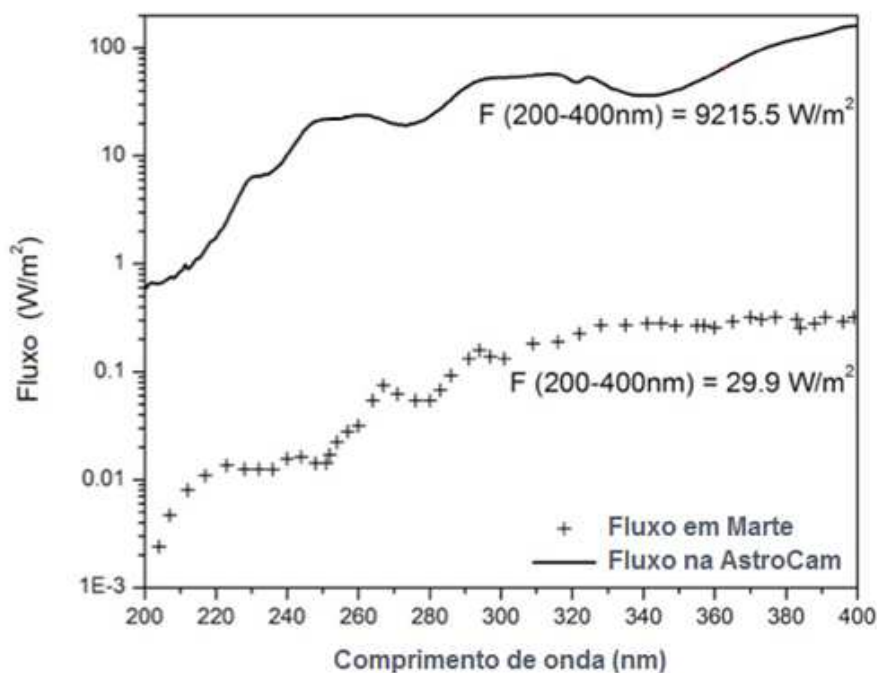


Figura 10 – Comparação das formas espectrais e intensidades do Sol na superfície de Marte e a emitida pelo simulador solar dentro da AstroCam.

2.2.3 Linha de luz TGM

Pastilhas de *D. radiodurans* pura foram também submetidas a irradiação espacial simulada na linha TGM do LNLS, figura 12, sendo utilizada uma montagem experimental para medir reflectância no UV-Vis *in situ*, em uma câmara experimental padrão. A câmara experimental opera em uma pressão de aproximadamente 10^{-7} mbar, bombeada com bomba turbo-molecular e conectada diretamente à linha de luz, sem janelas. Para a realização do experimento foi instalado um passante de vácuo para a fibra óptica, como no esquema da figura 11.

Foi utilizada uma fibra óptica do tipo SR (*solar resistant*) com 1 m de comprimento e 600 μm de abertura da *Ocean Optics*. Ela foi alinhada com a amostra e o feixe síncrotron incidente em um ângulo de aproximadamente 30° , sempre mantendo a ponta da fibra o mais próximo possível da amostra, mas sem tocá-la. Utilizamos CAS (Alumino Silicato de Cálcio) como padrão de referência para reflectância total (branco, reflectância assumida como 100%) antes de

iniciar a aquisição dos dados na amostra, e para a medida do escuro (0% da reflectância) todas as válvulas da linha e janelas da câmara foram fechadas.

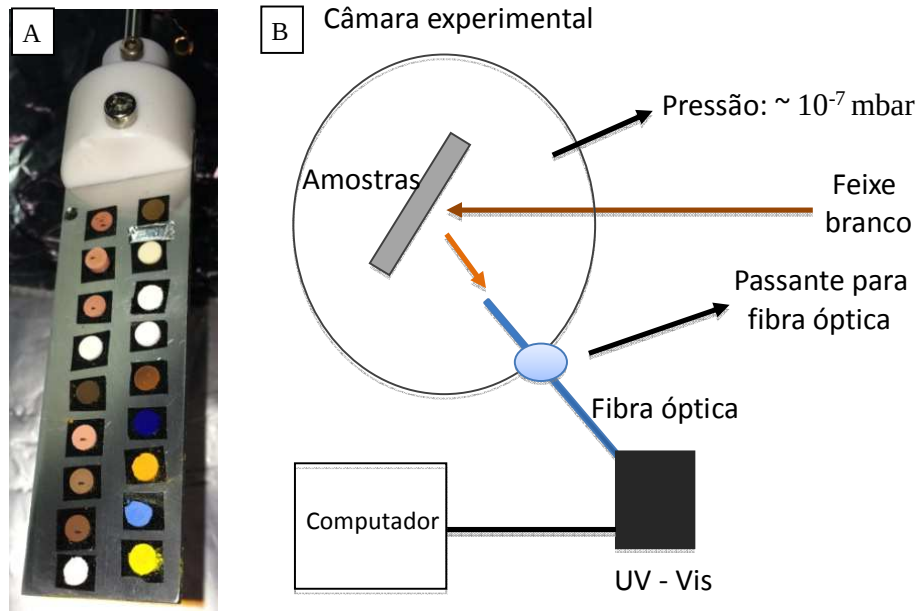


Figura 11 – Em (A) foto do porta-amostras com pastilhas de alguns padrões testes para a reflectância difusa *in situ*, e duas pastilhas de *D. radiodurans*. (B) o esquema da montagem da câmara padrão para o experimento. O feixe branco incidente na amostra não é monocromatizado, sendo o feixe síncrotron da saída do dipolo D05 do LNLS após passar pelos elementos ópticos da linha de luz TGM.

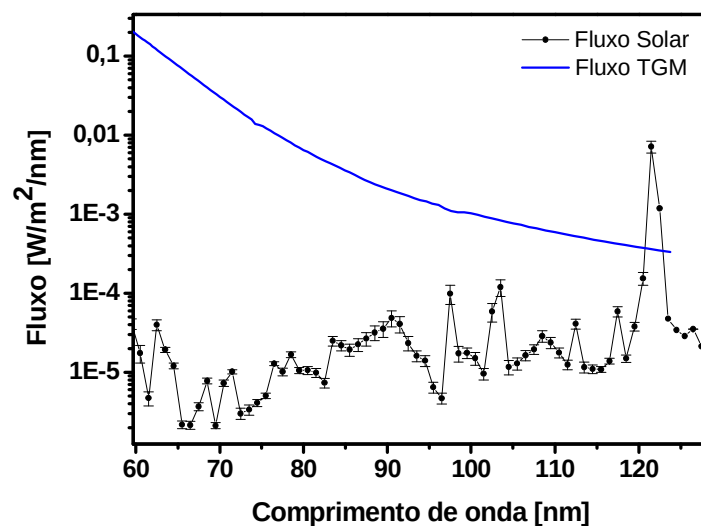


Figura 12 – Comparação entre o fluxo solar no espaço e o da linha TGM em feixe branco, na região de ultravioleta de vácuo (Abrevaya.; 2011).

2.3 Análises espectroscópicas

2.3.1 Espectroscopia Raman

Todas as pastilhas foram caracterizadas por dois modelos de espectrofotômetros Raman, um microRaman de bancada com excitação em 785 nm, Ranishaw inVia, do Núcleo de Pesquisa em Astrobiologia da Universidade de São Paulo (USP), e pelo espectrofotômetro portátil da Enwave Optronic com excitação em 532 nm, que se encontra na Departamento de Física Nuclear do Instituto de Física da USP.

Cada pastilha foi mapeada com o espectrômetro Raman 785 nm, para coletar automaticamente 12 espectros em diferentes posições da amostra, garantindo uma melhor estatística em caso de inomogeneidades, figura 13. A potência do laser (17 mW, total) foi ajustada a fim de não causar danos à amostra, com variação de 0.5% a 1% da potência total (valores definidos após testes de degradação por modificação visual e do espectro), e com os valores ajustados sendo otimizados para cada substrato. Foram realizadas cerca de 30 a 50 acumulações com objetiva de 20x, e 5 s de tempo de acumulação para cada ponto. A banda do Si em 520.7 cm^{-1} foi usada para calibração em número de onda.

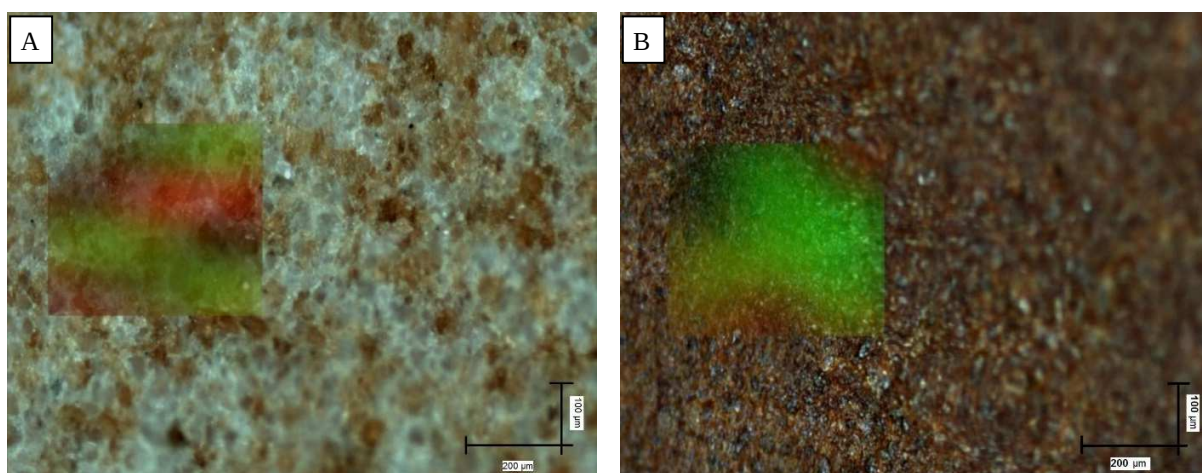


Figura 13 – Mapa obtido pelo espectrofotômetro Raman de bancada das pastilhas com a mistura da bactéria com CaCO_3 (A) e FeO(OH) (B), em vermelho é a intensidade da banda em ca. 1513 cm^{-1} e em verde é o sinal de fundo do espectro (background).

Após obter o mapa de cada pastilha e realizar a média dos espectros, conseguimos observar o sinal das bandas do carotenóide em ca. 1154 cm^{-1} , 1513 cm^{-1} e do pó de diamante em ca. 1333 cm^{-1} nos diferentes substratos, figura 14.

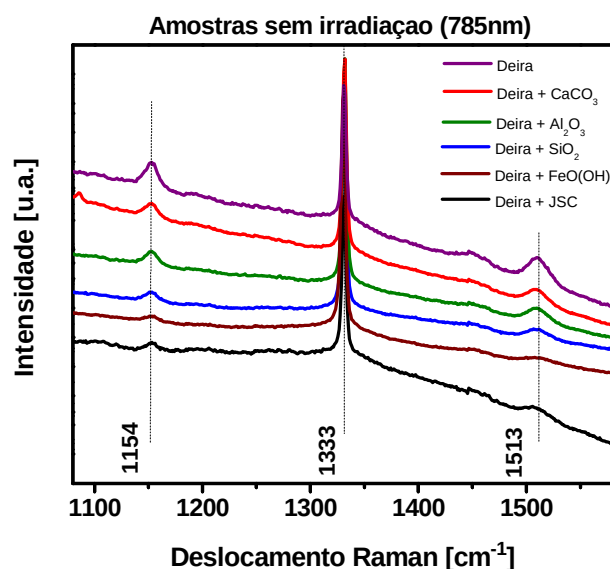


Figura 14 – Espectro Raman com o laser 785 nm após realização das médias dos espectros obtidos no mapeamento das pastilhas de bactéria pura e em diferentes substratos, antes de serem irradiadas (*D. radiodurans* está nomeada como Deira).

No espectrômetro Raman 532 nm, realizamos a média de duas medidas, em dois pontos diferentes de cada pastilha. A potência do laser foi ajustada no 1º estágio do equipamento para não haver danos às biomoléculas.

2.3.2 Refletância difusa com esfera integradora em bancada

Os espectros de absorção no UV-Vis das misturas não irradiadas foram medidos em um espectrofotômetro Shimadzu UV-3101PC, com resolução máxima de 0.1 nm, que se encontra no Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM - IQ/USP). Os espectros foram feitos por refletância difusa no visível com a esfera integradora UV-Vis (Shimadzu, modelo ISR-3100) utilizando BaSO_4 (Allied Signal) como padrão de refletância e os espectros foram submetidos à

transformada de Kubelka-Munk (KM) para se obter a medida em absorção, equação [02]. Esta transformada relaciona a reflectância difusa absoluta (R) com os coeficientes de espalhamento (s) e de absorção molar (k), da seguinte maneira. (Loyalka; 1995):

$$f(KM) = \frac{(1 - R)^2}{2R} = \frac{k}{s} \quad [02]$$

2.3.3 Refletância difusa *in situ* na linha de luz TGM

Com a incidência do feixe branco síncrotron na amostra, há a absorção e a reflexão da luz, sendo a reflexão captada pela fibra óptica instalada em um passante de vácuo e levada ao espectrofotômetro UV-Vis *Ocean Optics* QE65000. Os espectros de reflectância foram feitos calculando a média de 50 scans com 100 ms de acumulação cada, através do software *Ocean Optics Spectra Suite*, salvos a cada 5 min de exposição ao feixe branco. Foi utilizada a matriz de CAS como padrão para o branco. Os pontos mais escuros da pastilha, figura 11 (A), são resultados da fotodegradação devido ao feixe branco. Durante toda a irradiação, a intensidade da reflectância foi monitorada, para se obter o delta de reflectância das bandas associadas à bactéria. Os cálculos serão descritos em maior detalhe na seção 2.4.

2.4 Tratamento dos dados

2.4.1 Espectroscopia Raman

Para o tratamento dos dados Raman, foi utilizado um script em MatLab-2001a® para o processamento automatizado, devido ao grande número de espectros. Antes da implementação do *script* ele foi testado e comparado com manipulações manuais em alguns conjuntos de dados, de maneira a garantir a confiabilidade do mesmo. Pelo script, foi realizada a média dos espectros de cada pastilha para os diferentes comprimentos de onda dos lasers de cada espectrômetro Raman, e as bandas dos carotenoides foram normalizadas pela intensidade da banda do pó de

diamante. Para análise de degradação da biomolécula, suas bandas características foram comparadas com cada conjunto de pastilhas de um mesmo substrato e que foram irradiados com diferentes doses.

Observamos que não há deslocamento das bandas Raman do carotenoide e do diamante após a exposição à diferentes doses de radiação, portanto pudemos definir, no eixo x, limites fixos superiores e inferiores de cada banda.

Com o ponto de máxima intensidade encontrado na região definida pelos limites, o script encontra os valores mínimos para traçar uma linha de base para cada ponto nesse eixo e fazer a subtração dessa reta, figura 15.

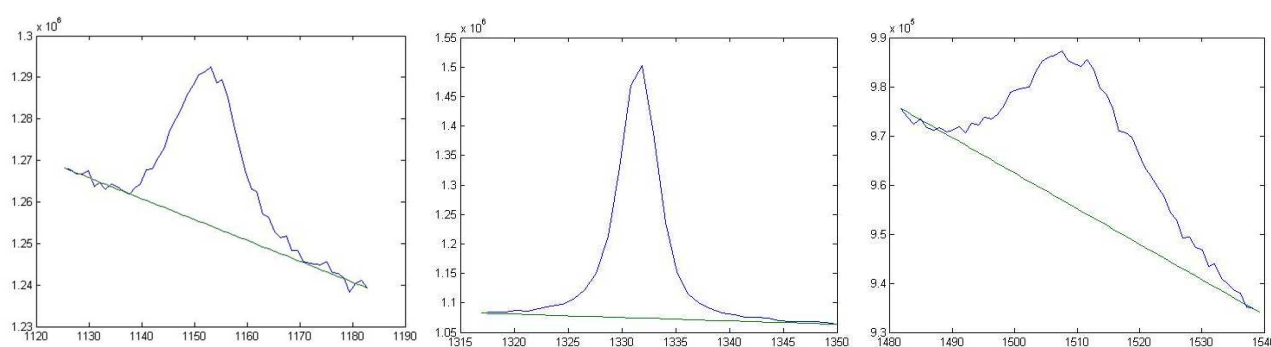


Figura 15 – Imagens geradas pelo software MatLab-2001a® de um dos espectros gerados pelo Raman 785 nm da mistura da bactéria com SiO₂ antes de ser irradiada. Em azul temos o espectro e em verde a equação da reta.

Após a subtração da linha de base, foram obtidos novos valores para o eixo vertical, gerando um novo conjunto de dados, o que possibilita a realização de um ajuste por uma função Lorentziana. Após o ajuste, foi calculada a área de cada uma das bandas, bem como sua largura e valor de máxima intensidade.

Com esses valores foi realizada a média de cada banda em relação à intensidade, largura a meia altura (FWHM), e a área dos espectros gerados de cada pastilha. A média da intensidade das bandas do carotenoide em ca. 1154 cm⁻¹ e 1513 cm⁻¹ foi normalizada pela média da intensidade da banda do pó de diamante em ca. 1333 cm⁻¹. O uso desse padrão interno permitiu a comparação das intensidades das bandas nos vários experimentos.

2.4.2 Espectroscopia UV-Vis

Para as medidas de reflectância obtidas pelo equipamento de bancada Shimadzu, fizemos a transformada de KM automaticamente através de uma opção do software do equipamento. Na linha TGM, o fluxo diminui em função do tempo e não é possível fazer a medida de um I_0 antes da amostra para efetuar a correção dessa variação, por construção da própria linha. Na figura 16, pode-se observar que essa mudança independe do comprimento de onda, ou seja, não deforma o espectro. Para corrigir essa variação em intensidade, subtraímos uma linha base em cada banda a ser estudada, obtendo assim a intensidade de cada banda em função do tempo de irradiação.

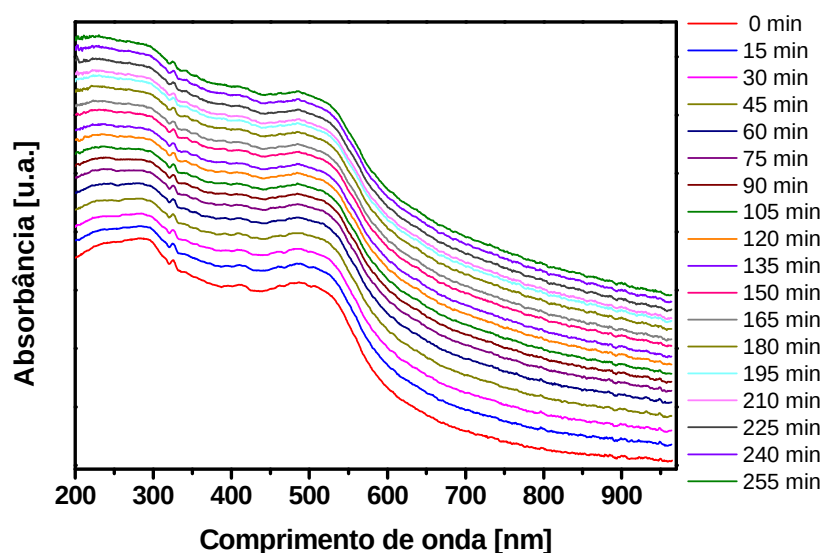


Figura 16 – Espectros de absorção obtidos na linha TGM variando o tempo de exposição ao feixe branco.

Com a estabilidade da forma do espectro na linha TGM, utilizamos para o cálculo do delta da reflectância uma das componentes do espectro, a banda em ca. 519.34 nm. Os passos são descritos na equação [5], onde (reflect) é a intensidade da reflectância em um dos três pontos escolhidos.

Em (A), são estimados os valores para uma equação de reta entre os pontos 602.46 e 437.12 nm, e o coeficiente angular da reta (A) é calculado em (B). Com esses valores conseguimos calcular o delta de reflêctância da amostra (Δreflec) durante a irradiação.

$$A = \frac{(reflect(602.46) - reflect(437.12))}{(602.46) - (437.12)} \quad [3]$$

$$B = reflect(437.12) - A * (437.12) \quad [4]$$

$$\Delta reflect = (A * (519.34) + B) - reflect(519.34) \quad [5]$$

Os resultados do tratamento dos dados conforme esse procedimento foram graficados com o software OriginPro-8®, e serão apresentados no capítulo 3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Medidas Raman dos substratos e *D. radiodurans*

A espectroscopia Raman é considerada uma boa ferramenta para identificação de componentes orgânicos, tanto em minerais, como derivados de atividades biológicas no registro geológico, como os componentes inorgânicos em um sistema heterogêneo, sendo uma boa técnica para identificação de marcadores biológicos e geológicos, ou seja, promissora para a identificação de sinais de vida com conhecemos na Terra (Vitek *et al.*; 2009; Villar *et al.*; 2006; Edwards *et al.*; 2005).

A identificação de duas ou mais bandas Raman é importante para uma identificação confiável de compostos orgânicos ou inorgânicos (Villar *et al.*; 2006). Por exemplo, os carotenoides podem ser identificados por suas duas bandas Raman fortes em ca. 1154 e 1513 cm⁻¹, que correspondem às vibrações de estiramento da cadeia do polieno, sendo 1154 cm⁻¹ correspondente ao modo ν_1 (C - C) e a banda em 1513 cm⁻¹ ao modo ν_2 (C = C) (Vitek *et al.*; 2009; Marshall *et al.*; 2007; Gill *et al.*; 1970).

Os carotenoides por possuírem duplas ligações carbônicas tem uma transição π - π^* na região do visível, o que resulta em sua coloração. Isso significa que quando as bandas de absorção dos carotenoides coincidem com o comprimento de onda de excitação através da espectroscopia Raman, o sinal Raman é fortemente aumentado, o que resulta no efeito Raman ressonante (Vitek *et al.*; 2009; Withnall *et al.*; 2003).

O efeito Raman ressonante dos carotenoides ocorre com a excitação do laser em 532 nm, mas o laser em 785 nm é melhor para a diferenciação entre compostos orgânicos e inorgânicos pois o efeito de fluorescência é de menor intensidade em relação com laser em 532 nm.

Através do microRaman de bancada, com excitação em 785 nm, analisamos a região próxima às bandas de interesse da bactéria nos diferentes substratos, confirmando que não há sobreposições das bandas dos substratos puros em relação às bandas do carotenoide (figura 17). O mesmo foi realizado para o Raman portátil com laser em 532 nm. Pudemos assim garantir que os substratos não interferiram, a priori, nas medidas de detectabilidade das bandas do carotenoide quando realizamos a mistura do substrato com a bactéria.

Na figura 17 estão demonstrados os espectros Raman dos substratos utilizados e da *D. Radiodurans* obtidos com o microRaman 785 nm. O que demonstra que as bandas características de cada substrato não interferem na detecção das biomoléculas do carotenoide através da sobreposição das bandas entre os substratos com as da bactéria, pois isso não ocorre.

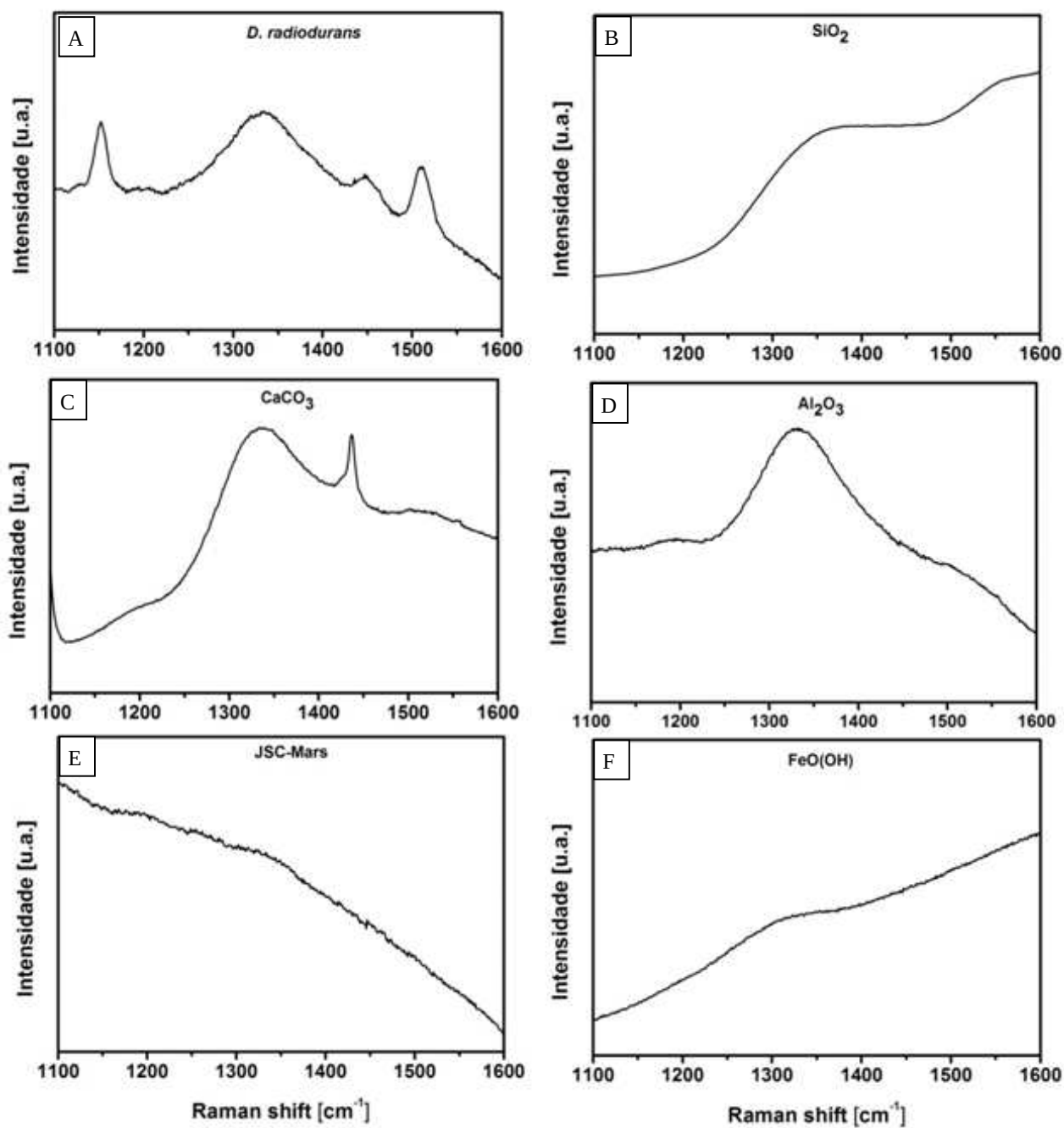


Figura 17 – Espectros Raman da bactéria e dos diferentes substratos obtidos com excitação em 785 nm, objetiva 20x e 5 acumulações.

3.2 Medidas Raman dos ambientes simulados

3.2.1 Simulação UV ambiental

Observamos que, após exposição a diferentes tempos de exposição ao simulador solar UV ambiental, houve a diminuição do sinal do carotenoide, como podemos observar nos gráficos da figura 18, onde (A) é a médias dos espectros normalizados, medidos com o laser 532 nm após exposição ao UV ambiental, e (B) apresenta a intensidade da banda em ca. 1513 cm^{-1} , medido com laser em 785 nm. Em (A), podemos observar que não houve formação ou eliminação de bandas após a exposição à radiação, o mesmo ocorrendo nos outros substratos e para os dois lasers utilizados.

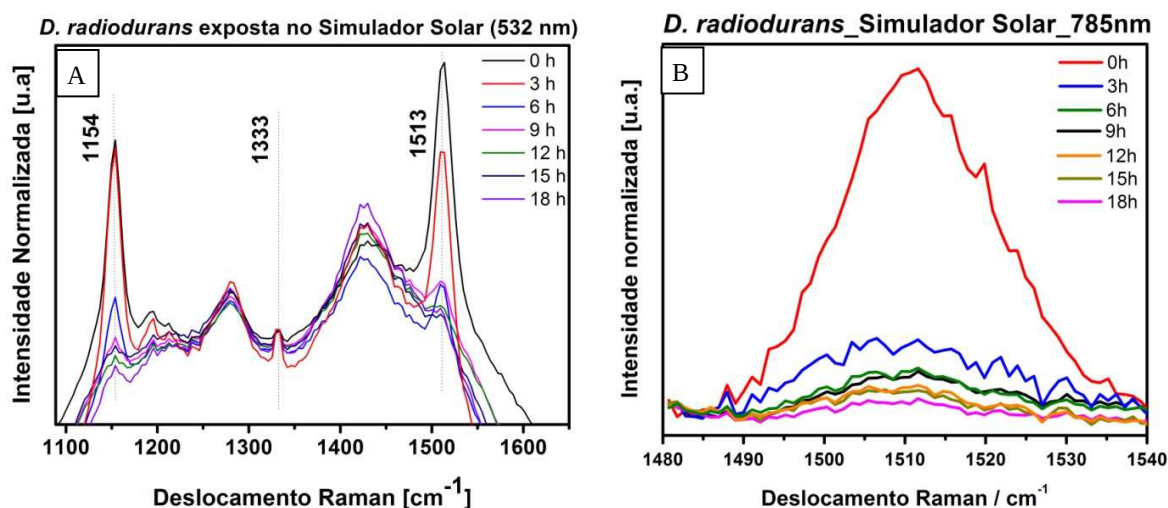


Figura 18 – (A) Espectros normalizados das médias das misturas de bactéria com SiO₂, obtidos com o Raman portátil em 532 nm, após exposição ao simulador solar UV ambiental. (B) Diminuição da intensidade da banda em ca. 1513 cm^{-1} das pastilhas de bactérias após exposição no simulador solar UV ambiental, sendo os espectros medidos com laser 785 nm e com a normalização feita pela banda do diamante em 1333 cm^{-1} .

Esse procedimento foi realizado de forma sistemática para a medida da intensidade das bandas do carotenoide após os diferentes tempos de irradiação, fazendo-se a média dos espectros tirados por mapeamento de vários pontos por pastilha, seguindo o procedimento descrito na

seção 2.4. Os resultados compilados são apresentados através das figuras 19 e 20 para a irradiação com simulador solar ambiental através dos lasers 785 nm e 532 nm.

Optamos por considerar somente a intensidade das bandas, pois foi observado que não há mudanças significativas em sua largura à meia altura (FWHM) em função do tempo de exposição. O mesmo procedimento com a medida da área levou a resultados equivalentes ao da medida de intensidade, e não são aqui apresentados.

A normalização das proporções de pó de diamante (padrão interno) em relação as proporções em massa de bactéria e substratos foi otimizada utilizando o microRaman de bancada com o laser em 785 nm. Pode-se observar através dos testes experimentais no desenvolvimento do protocolo de medidas que a intensidade da banda do padrão interno é muito mais intensa em relação as bandas dos carotenoides da *D. radiodurans*. Após os testes de proporção dos componentes para a montagem das pastilhas foram iniciadas as exposições aos diferentes ambientes e o mapeamento das amostras por espectroscopia Raman.

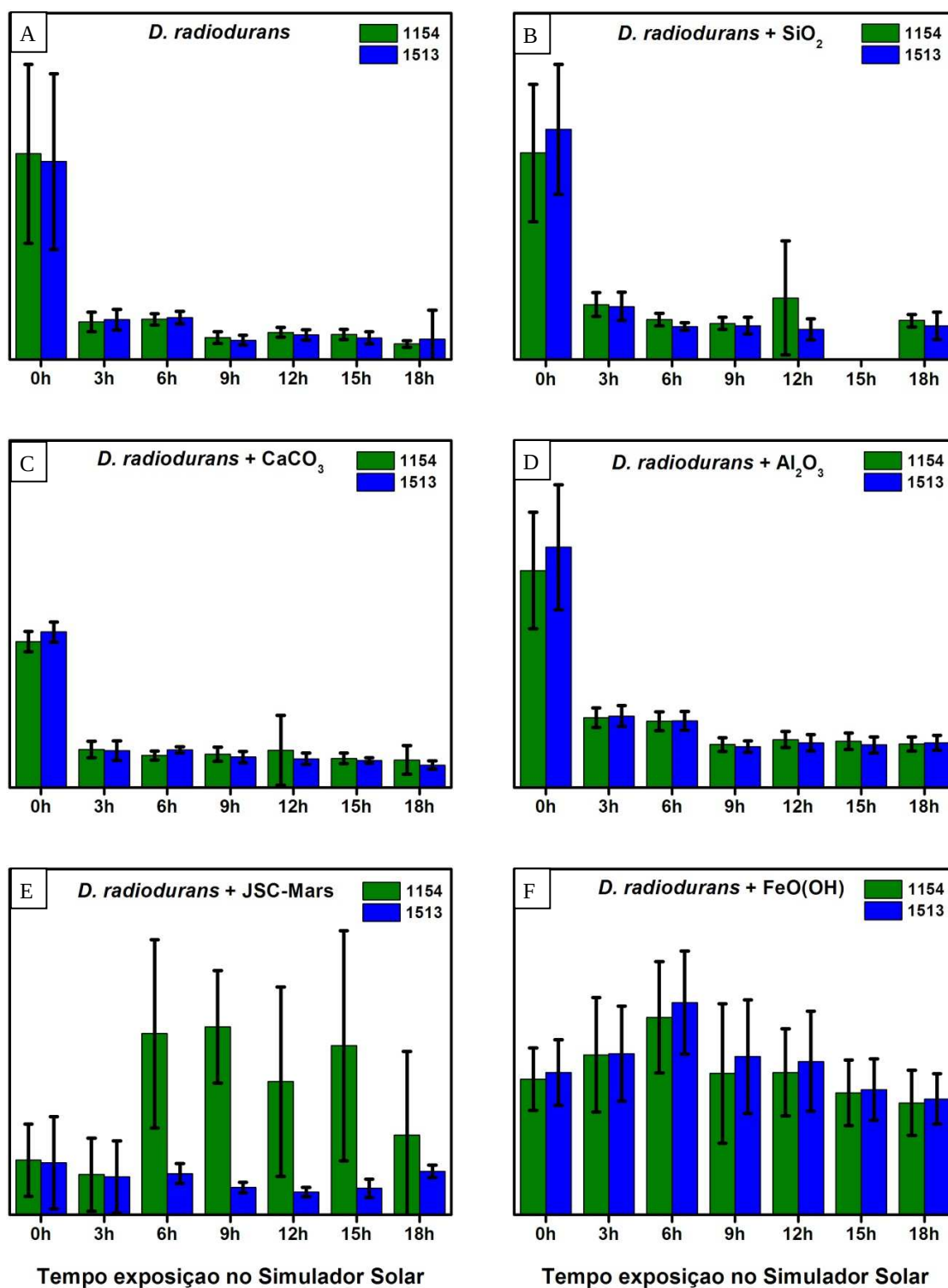


Figura 19 – Comparação das intensidades das bandas ca. 1154 cm^{-1} , 1513 cm^{-1} da *D. radiodurans* pura e em diferentes substratos após serem irradiadas pelo simulador solar UV ambiental por diferentes tempos de exposição. Medidas realizadas com espectrômetro microRaman de bancada com laser em 785 nm .

Na comparação dos gráficos apresentados na figura 19, pode-se observar a tendência da diminuição do sinal das bandas em ca. 1154 cm^{-1} e 1513 cm^{-1} da *D. radiodurans* quando misturadas em diferentes substratos após exposição ao simulador solar. No gráfico da mistura da cultura da bactéria com o SiO_2 , no ponto de 15 h de exposição ao simulador solar há uma falha, pois não foi possível detectar as bandas do carotenoide, possivelmente devido à não-homogeneidade da pastilha ou a algum erro experimental.

Nas misturas de *D. radiodurans* com $\text{FeO}(\text{OH})$ e com solo simulado de Marte, observa-se um maior erro estatístico nas medidas, isso é devido à dificuldade de se obter o sinal do carotenoide pela grande fluorescência dos substratos, e possível não-homogeneidade das pastilhas. Mesmo com grande erro estatístico, pudemos observar a tendência na diminuição da intensidade do sinal após exposição à radiação solar simulada. Na maioria dos casos em que foi possível uma boa medida do sinal, nota-se uma diminuição abrupta após a primeira irradiação e depois relativa estabilidade, com ligeiro decréscimo.

Nas compilações dos gráficos na figura 20, podemos observar a mesma tendência de queda na intensidade do sinal do carotenoide da bactéria tanto para as misturas nos diferentes substratos como nas pastilhas puras (somente com bactéria e pó de diamante).

Não são apresentadas barras de erro nesses gráficos, pois foram realizadas medidas de 4 pontos das pastilhas com o Raman portátil com o laser em 532 nm, por limitações experimentais, inviabilizando a definição correta da distribuição estatística. No entanto, mesmo com a baixa estatística de pontos por amostra e pior razão sinal ruído em relação ao microRaman de bancada, pode-se observar a mesma tendência na diminuição da intensidade de detecção do sinal das bandas dos carotenoides.

Tanto nos substratos mais escuros (solo simulado de Marte e $\text{FeO}(\text{OH})$) como nos substratos mais claros houve o efeito Raman ressonante quando utilizado o laser em 532 nm, ou seja o sinal das bandas dos carotenoides se intensificaram como esperado. E em alguns casos, como das pastilhas com a mistura dos substratos mais escuros, houve a impossibilidade de identificação do sinal do pó de diamante devido ao intenso sinal das bandas do carotenoide devido ao efeito Raman ressonante, o que impossibilitou a realização da normalização nas bandas pelo padrão interno. Este é o caso dos dados faltantes das figuras 20E e 20F.

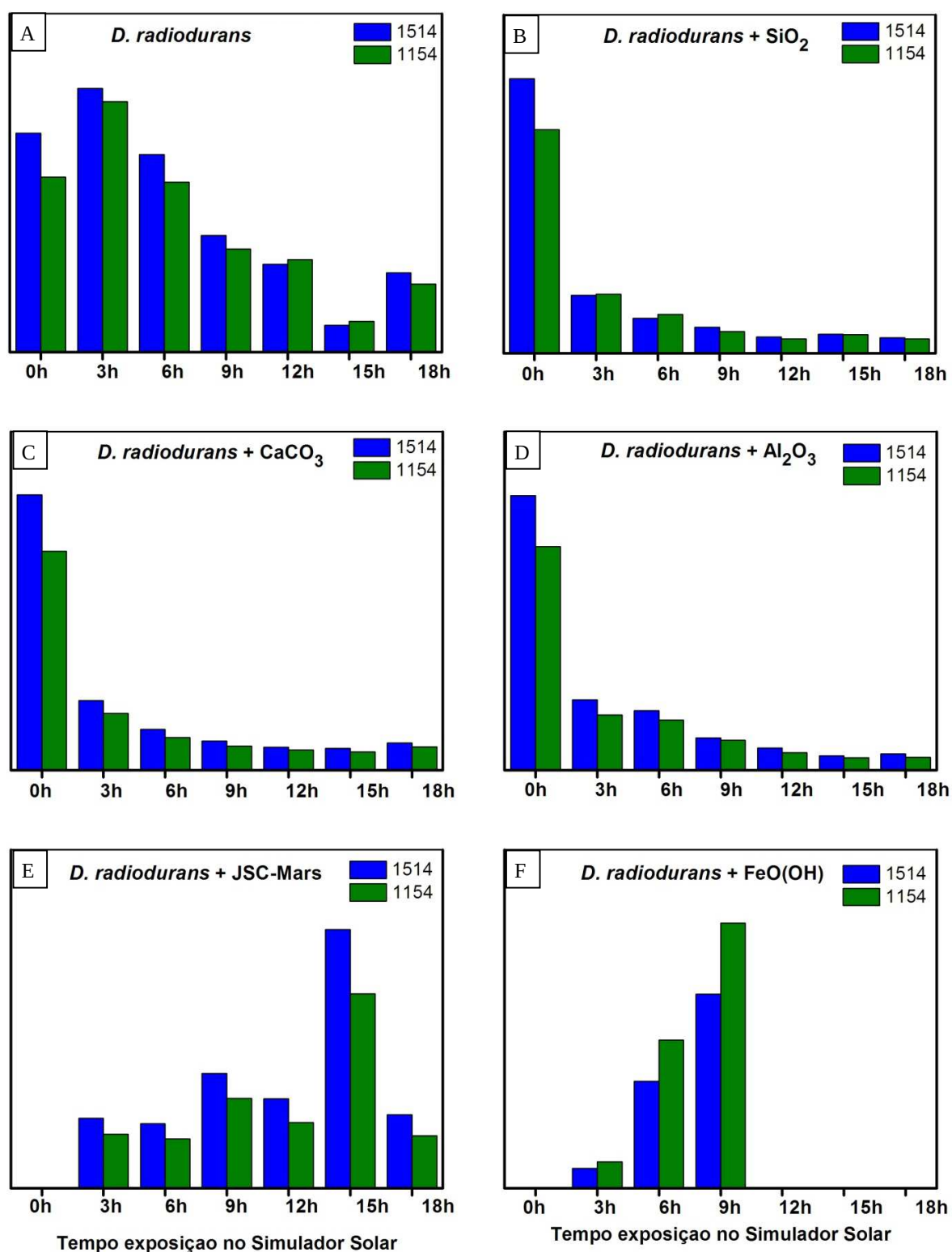


Figura 20 – Comparação das intensidades das bandas ca. 1154 cm⁻¹, 1513 cm⁻¹ da *D. radiodurans* pura e em diferentes substratos após serem irradiadas pelo simulador solar UV ambiental em diferentes tempos de exposição, através do espectrômetro Raman portátil com laser em 532 nm.

3.2.2 Simulação na câmara planetária e espacial - AstroCam

A radiação UV é capaz de penetrar algumas centenas de micrômetros nos diferentes substratos (Parnell *et al.*, 2007 e Caro *et al.*, 2006), portanto os danos causados por ela devem estar limitados a essa região superficial do solo. Isso se reflete em nossas medidas, pois conseguimos visualizar os danos (diminuição de intensidade das bandas, pelas diferentes técnicas) causados pelas condições ambientais e de irradiação até um certo limite temporal (Verkaaik *et al.*, 2015).

Após as pastilhas das misturas e da bactéria serem expostas às condições marcianas, conforme descrito na seção 2.2.2, observamos uma tendência semelhante ao que ocorreu após diferentes exposições ao simulador solar UV ambiental. Também há a tendência da diminuição gradual do sinal das bandas do carotenoide da *D. radiodurans* após exposição às condições extremas das simulações, tanto com o laser 785 nm e 532 nm (figuras 21 e 22).

Observa-se que, para os substratos mais claros, analisados pelo laser em 785 nm, a queda inicial após se iniciar a exposição aos diferentes ambientes foi menos abrupta para as condições marcianas de simulação. E houve a mesma dificuldade na identificação das bandas do carotenoide para os substratos mais escuros devido ao efeito de fluorescência dos substratos, figura 21. Isso ocorre, pois o efeito Raman é menos intenso para o laser em 785 nm, e os materiais tem alta absorção da luz (especialmente no caso do laser em 523 nm), piorando a relação sinal/ruído dos espectros e a consequente detecção das bandas.

Comparando a análise através do laser portátil em 532 nm e com o microRaman em 785 nm, em relação aos dois ambientes simulados, a queda da intensidade do sinal das bandas do carotenoide foi mais intensa quando expostas ao simulador solar UV ambiental.

Também não foi possível realizar o tratamento dos dados para as pastilhas que não foram expostas à irradiação das misturas da bactéria com o solo simulado de Marte (JSC), e após a exposição a 10 kJ/m² da mistura das bactérias com o FeO(OH), apresentados na figura 22, devido ao efeito Raman ressonante nas bandas do carotenoide. As bandas do carotenoide se intensificaram e não foi possível detectar o sinal da banda do pó de diamante nos espectros, com isso não foi possível realizar o cálculo da normalização das bandas em relação ao padrão interno de cada pastilha.

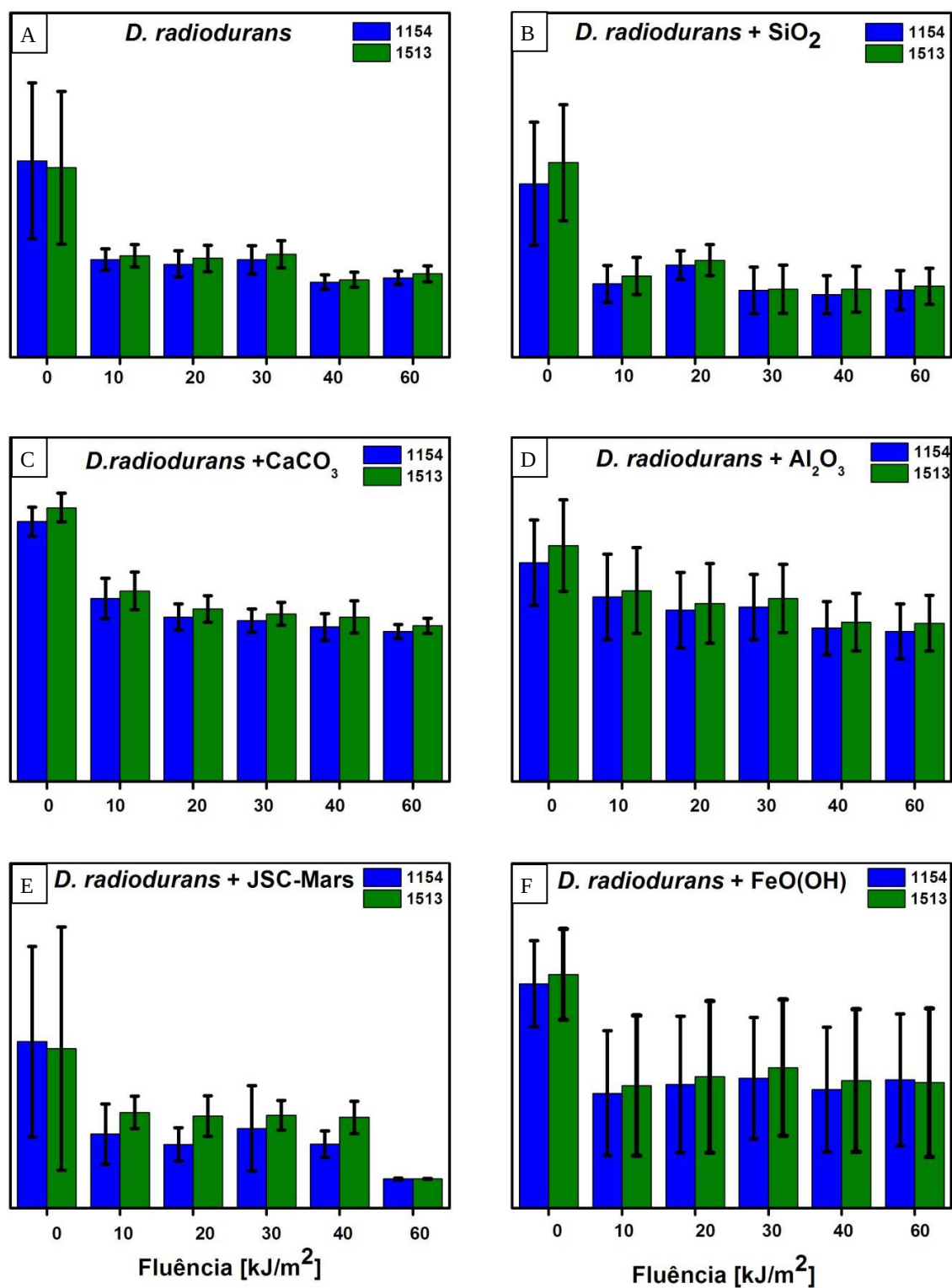


Figura 21 – Comparação das intensidades das bandas ca. 1154 cm⁻¹, 1513 cm⁻¹ da *D. radiodurans* pura e em diferentes substratos após serem irradiadas na AstroCam, através do espectrômetro Raman de bancada 785 nm.

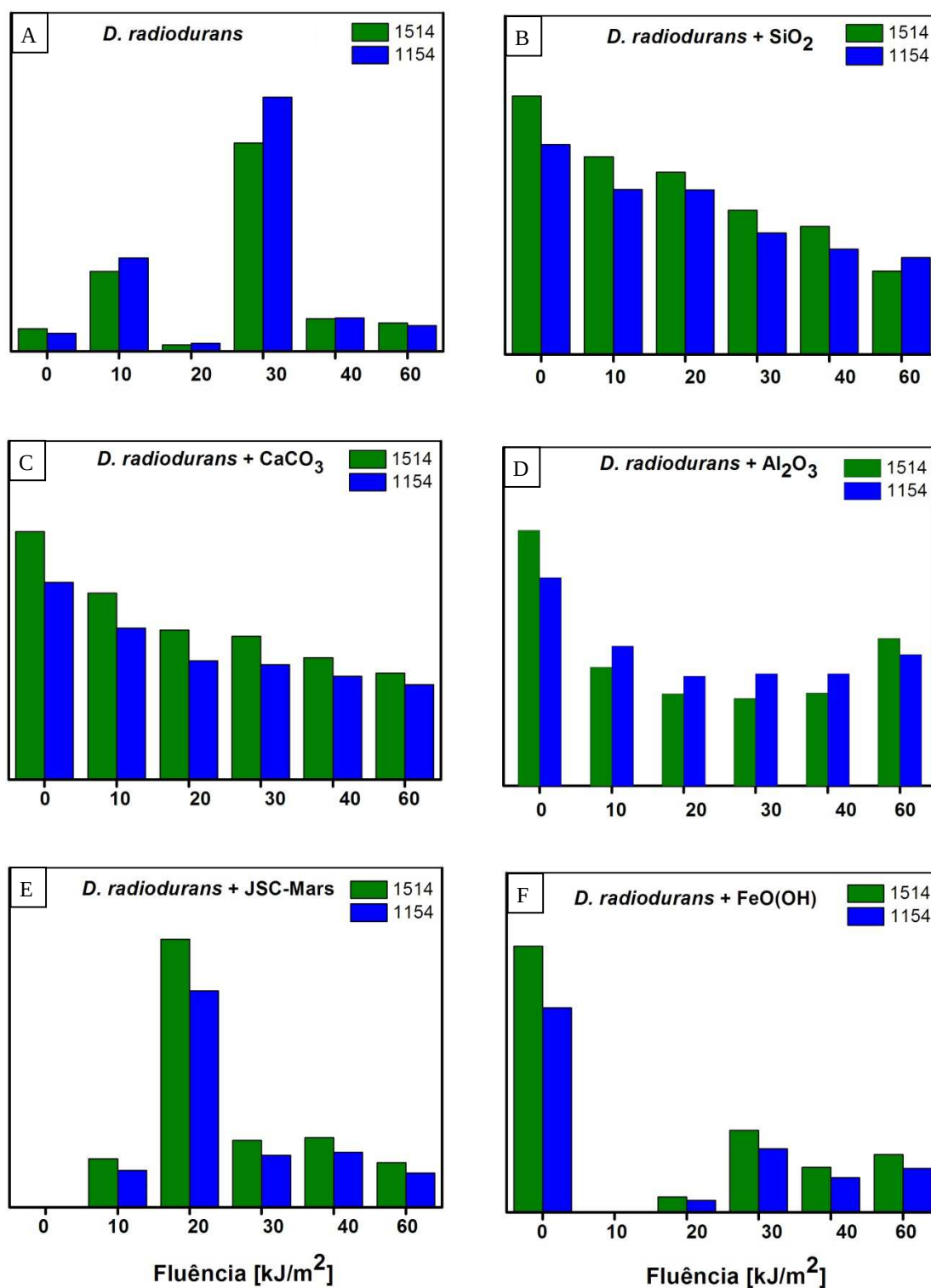


Figura 22 – Comparação das intensidades das bandas ca. 1154 cm⁻¹, 1513 cm⁻¹ da *D. radiodurans* pura e em diferentes substratos após serem irradiadas na AstroCam, através do espectrômetro Raman portátil 532 nm.

3.3 Medidas de reflectância difusa com esfera integradora dos substratos e *D. radiodurans*

Utilizamos o espectrofotômetro de bancada no UV-Vis com uma esfera integradora para identificar as bandas de absorção dos substratos e da bactéria. Na primeira análise obteve-se a absorção dos substratos puros para analisar onde se encontram as bandas de absorção características de cada material e poder compará-las com as bandas de absorção dos carotenoides da *D. radiodurans*.

Na figura 23 são apresentados os espectros de absorbância dos diferentes substratos. Observa-se duas classes de materiais, os mais claros, como SiO_2 , Al_2O_3 e CaCO_3 apresentaram valores de absorbância baixas, em alguns casos chegando a ser menores que do próprio branco utilizado, enquanto que os mais escuros ($\text{FeO}(\text{OH})$ e JSC1-Mars), com forte cor avermelhada, apresentam absorbâncias altas, acima de 1, em boa parte da região espectral investigada.

Em torno de 350 nm há um aumento abrupto na absorção em alguns casos. Isso é um artefato gerado quando o equipamento realiza a troca automática das lâmpadas de emissão.

Na figura 24, podem-se observar bandas de absorção da *D. radiodurans* entre 400 e 550 nm como esperado para os carotenoides presentes, bem como uma absorção intensa entre 220 e 300 nm (provavelmente por compostos cíclicos presentes em aminoácidos, ácidos nucleicos, açúcares). Não é trivial fazer atribuições das bandas de absorção do organismo inteiro, portanto, essas indicações devem feitas com cautela. Quando misturada nos diferentes substratos, essas bandas se tornam menos visíveis. Nos substratos mais escuros, como o solo simulado de Marte (JSC) e o $\text{FeO}(\text{OH})$, não conseguimos observar a banda de absorção dos carotenoides, pois esses substratos apresentam, por si mesmos, uma grande absorção de 200 até 600 nm, aproximadamente. Já os materiais mais claros como SiO_2 , CaCO_3 , e Al_2O_3 , têm uma absorção muito menor nessa região espectral, permitindo ainda a medida dos sinais característicos da absorção dos carotenoides da *D. radiodurans*, apesar de menos evidentes que no caso da bactéria pura.

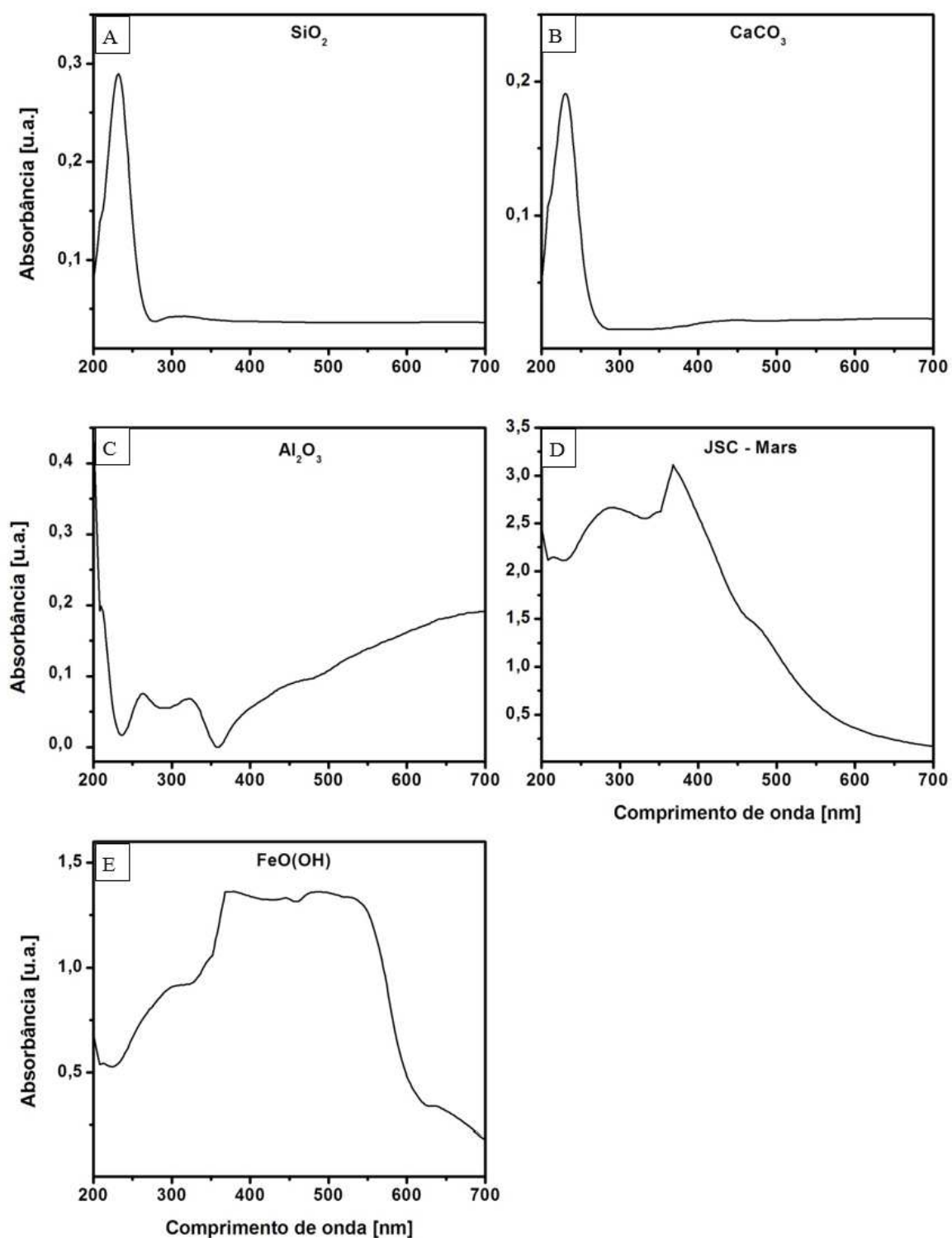


Figura 23 – Espectros da reflectância dos diferentes substratos testados, medidos no espectrofotômetro Shimadzu UV-3101PC com a esfera integradora, após serem submetidos à transformada de Kubelka-Munk e convertidos para absorbância.

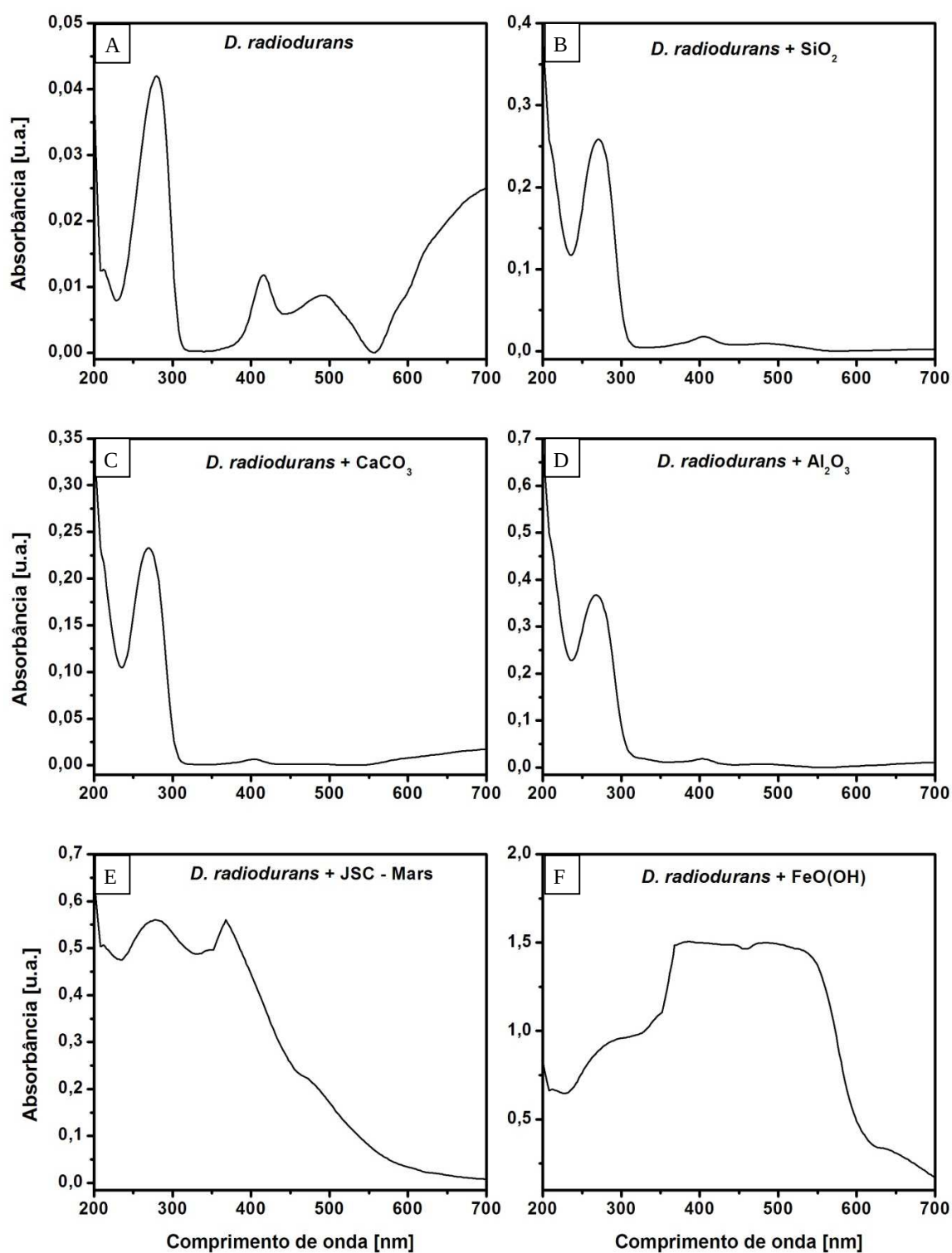


Figura 24 – Espectros da reflectância da *D. radiodurans* pura e da bactéria misturada com diferentes substratos obtidos através do espectrofotômetro Shimadzu UV-3101PC com a esfera integradora, após serem submetidos à transformada de Kubelka-Munk.

3.4 Medidas de reflectância difusa *in situ* na linha TGM

Com a comprovação da possibilidade de detecção da banda de absorção do carotenoide obtidos pelo espectrômetro de bancada com uma esfera integradora, pode-se iniciar as medidas *in situ* do biomarcador escolhido analisando sua degradação.

Nas medidas de reflectância difusa *in situ* na linha TGM do LNLS foi possível observar as bandas características da *D. radiodurans* para a pastilha da bactéria pura e para as misturas com substratos (espectro apresentado na figura 25, em comparação com espectro de referência da literatura para a bactéria inteira).

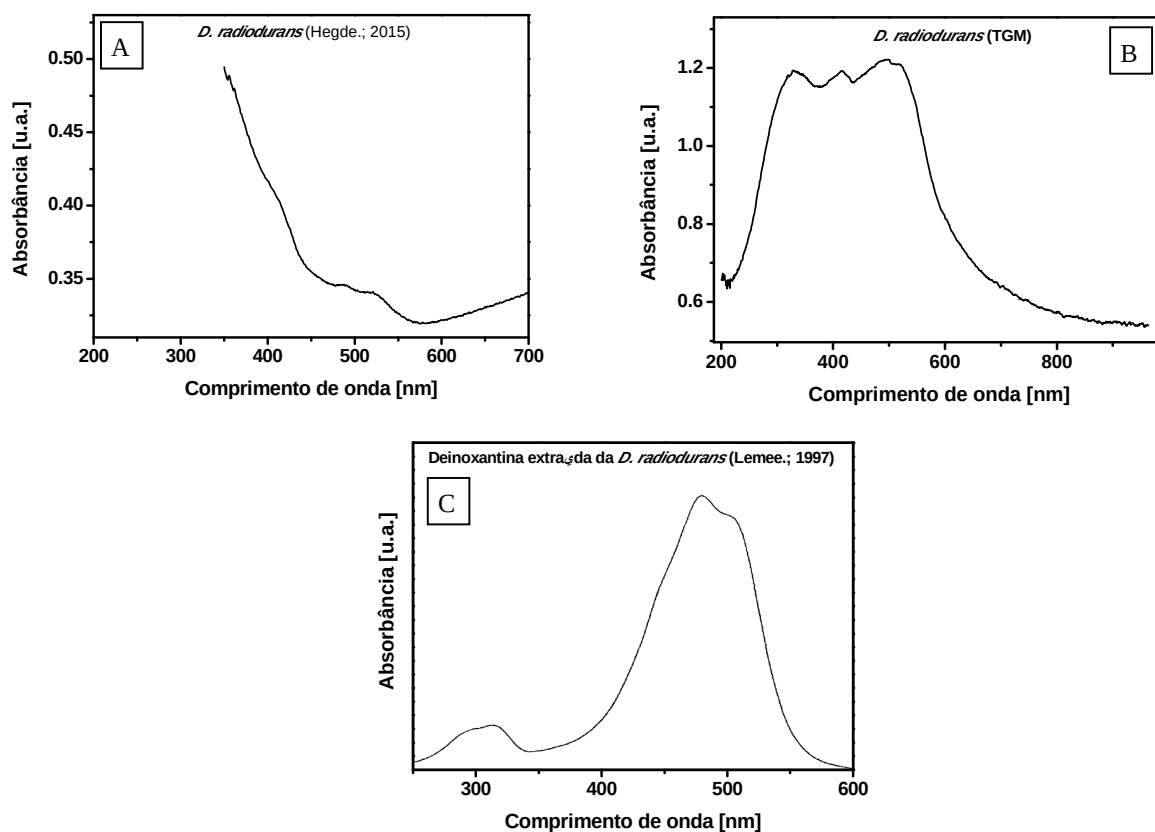


Figura 25 – Em (A) espectro de reflectância da *Deinococcus radiodurans* do banco de dados (Hegde.; 2015), e em (B) a medida da reflectância obtida na linha TGM. Em (C) temos o espectro da absorção da deinoxantina extraída da *D. radiodurans* (Lemee.; 1997).

Em sólidos, as bandas são tipicamente mais largas, por isso não é possível observar detalhes da estrutura do espectro eletrônico da deinoxantina em solução (Figura 25C). Além disso, a comparação direta entre os espectros da bactéria inteira e da deinoxantina extraída não

pode ser feita de maneira trivial, pois na bactéria o pigmento não está isolado e está em um ambiente químico diferente. Pode haver contribuição na absorção por outras moléculas do microrganismo, além de deslocamentos das bandas por efeito de solvente. Para os espectros de referência da base de dados da Cornell University³, comparado com o obtido na linha TGM, figura 26, pode haver algumas diferenças devido às condições de medidas, e dos equipamentos utilizados. Mesmo assim, eles são compatíveis.

Após as pastilhas com as misturas serem preparadas e inseridas na estação experimental da linha de luz TGM, foram coletados os espectros de absorbância de cada pastilha para verificar as características da banda de absorção do carotenoide, figura 26.

Foi necessário modificar a proporção em massa do solo simulado de Marte (JSC) para bactéria, para 90% de substrato para 10% de bactéria. Essa modificação foi necessária devido à grande absorção do substrato, o que impossibilitou a visualização da banda do carotenoide.

³ Disponível em <http://biosignatures.astro.cornell.edu/>

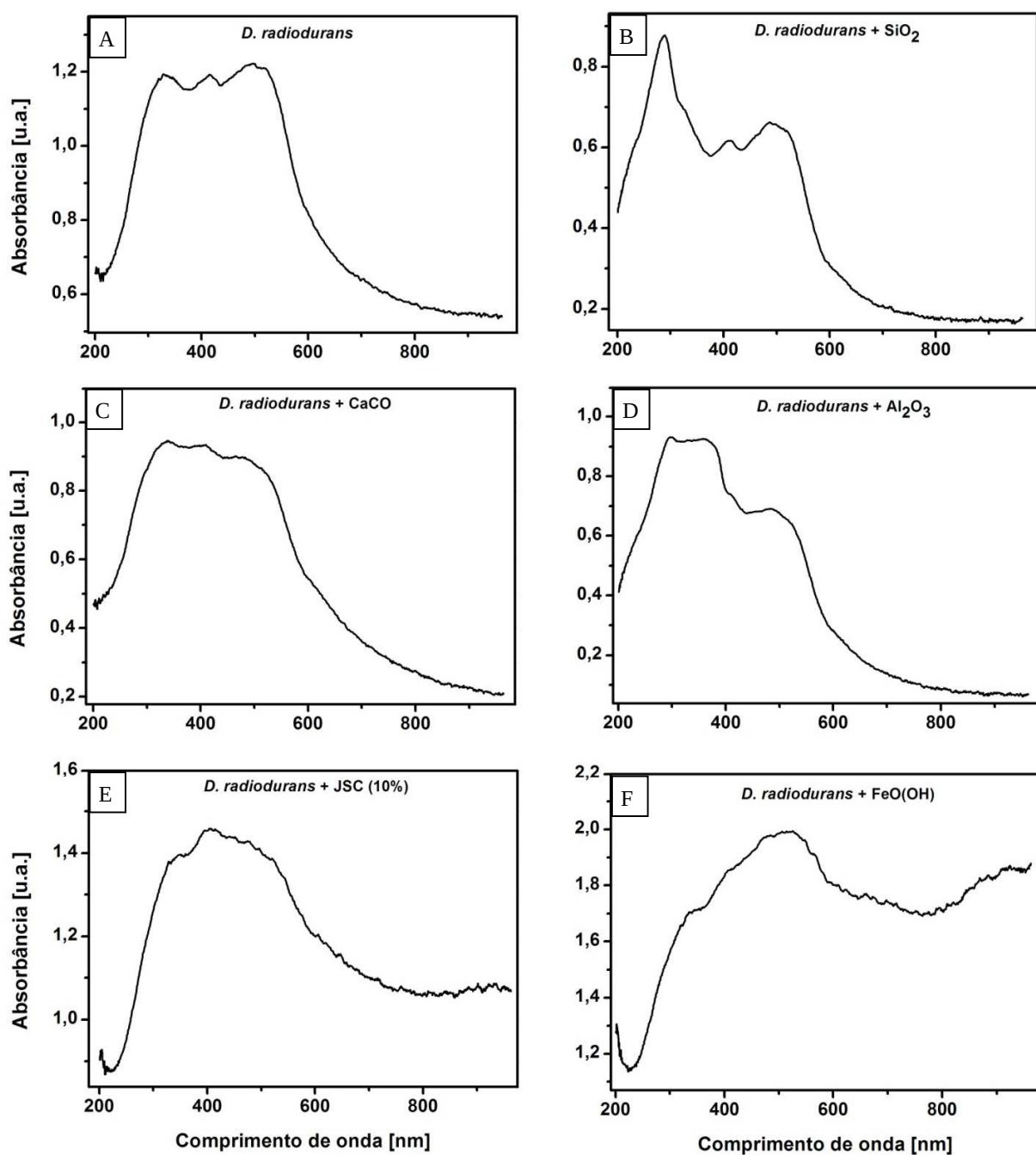


Figura26 – Espectros de absorvância da *Deinococcus radiodurans* pura e da mistura da bactéria com os substratos obtidos na linha TGM.

3.5 Simulação de UV espacial na linha TGM

Utilizando o procedimento descrito no item 2.4, analisamos a variação da intensidade da banda de absorção em 519.34 nm, observada no espectro da *D.radiodurans* (figura 27), em função do tempo de exposição ao feixe branco da linha TGM.

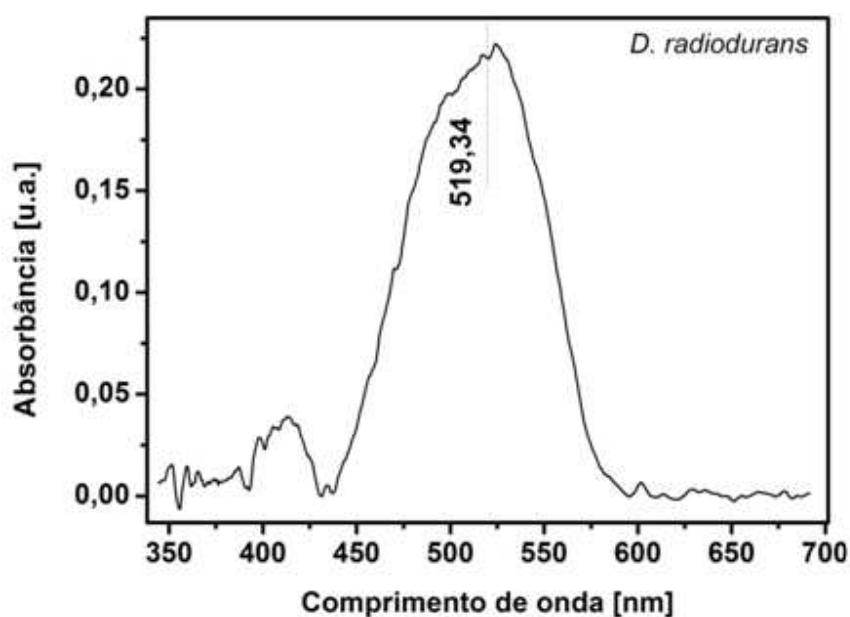


Figura 27 – Espectro de absorção obtido na linha de luz TGM por UV-Vis.

Para essa banda observada da bactéria, há uma tendência de diminuição na variação da refletividade (delta de reflectância) com o tempo de exposição ao feixe, o que é equivalente a dizer que há um aumento na reflectância devido a uma diminuição na absorção nessas faixas espectrais. O tempo de decaimento para essa banda foi diferente em cada substrato, observado na figura 28.

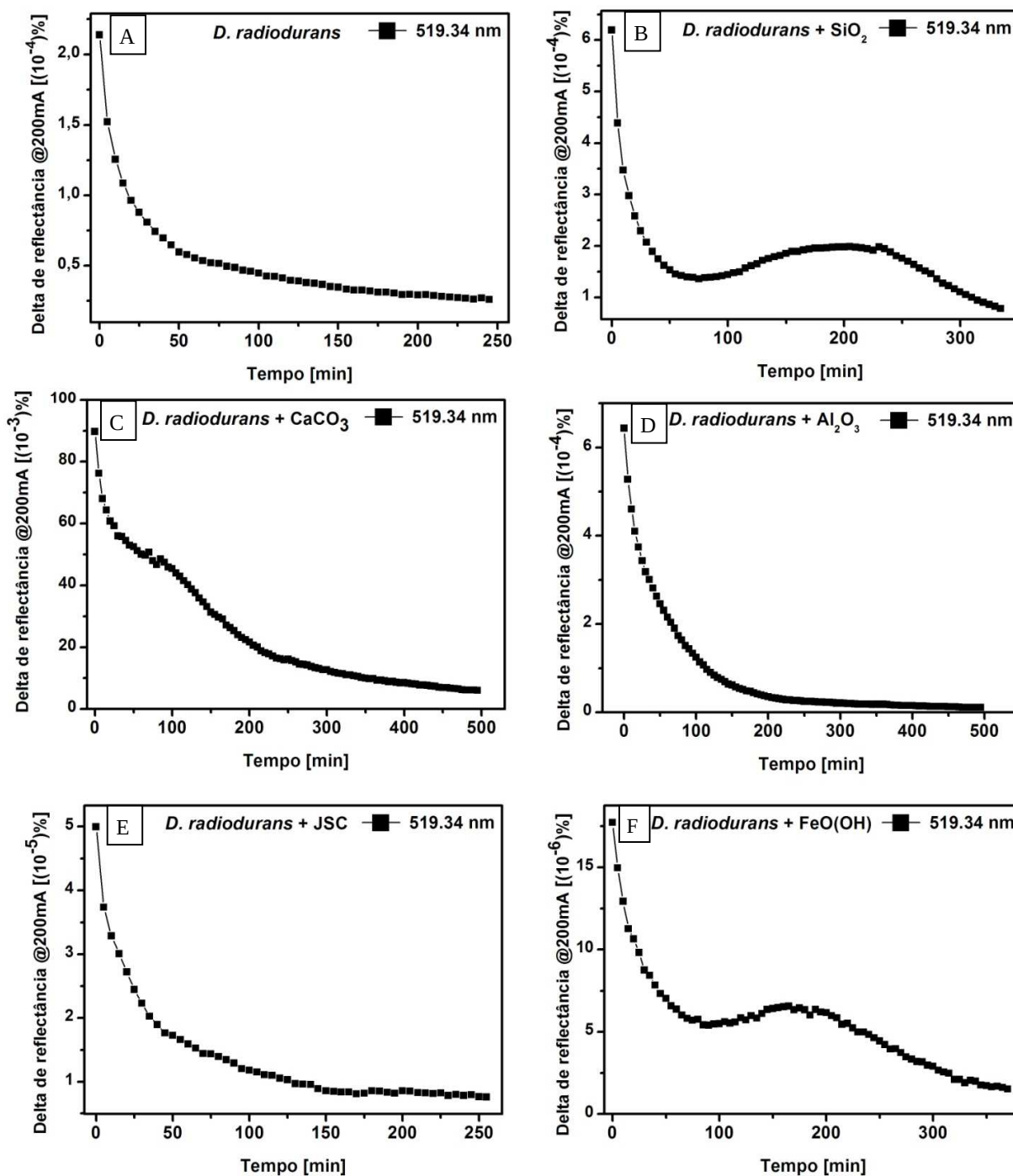


Figura 28 – Delta de reflectância após exposição da *D. radiodurans* e misturas em diferentes tempos na linha TGM, normalizados por uma corrente de 200mA.

Analisando experimentalmente, através dos espectros, pode-se observar que o tempo de meia vida do sinal do carotenoide varia dependendo do substrato conforme a tabela 01.

Pastilha	Tempo para meia vida do sinal [min]
<i>D. radiodurans</i>	25
<i>D. radiodurans</i> + SiO ₂	25
<i>D. radiodurans</i> + CaCO ₃	110
<i>D. radiodurans</i> + Al ₂ O ₃	50
<i>D. radiodurans</i> + JSC	25
<i>D. radiodurans</i> + FeO(OH)	40

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

Dentre as misturas analisadas e apresentadas na tabela 01, pode-se observar que a maior meia-vida foi a com CaCO₃, em cerca de 110 min. Podemos interpretar que esse efeito foi causado pela proteção conferida contra a fotodegradação pelo substrato, ou por uma leve alteração na coloração do substrato puro pela presença de algum contaminante.

4 CONCLUSÕES

Foram realizadas simulações ambientais com diferentes condições, após às quais foi possível observar o sinal das biomoléculas por espectroscopia Raman. As bandas em ca. 1154 e 1513 cm⁻¹ foram monitoradas em função do tempo de exposição aos ambientes simulados de alta radiação.

Observamos tipicamente uma queda rápida na intensidade das bandas dos carotenóides, no início da simulação, seguida de uma estabilização dos mesmos, sem alterações significativas nos diferentes substratos. Na pastilha com somente bactérias e pó de diamante também observamos essa tendência, e a possível proteção pode ser devido às células degradadas nas camadas superficiais da pastilha. Com os resultados obtidos, podemos concluir que as camadas superficiais do substrato agem como protetor em relação à radiação, e que, abaixo de algumas poucas centenas de micrômetros, seria possível encontrar biomoléculas menos fotodegradadas, portanto, melhor preservadas.

Como foi possível medir os espectros Raman em nossas simulações, é de se esperar que em Marte também seja possível aplicar a mesma metodologia, sem ser necessário raspar ou cavar a superfície. No entanto, em Marte o ambiente radiativo inclui também partículas carregadas de alta energia, provenientes do vento solar e raios cósmicos, que podem fazer com que a profundidade para encontrar moléculas preservadas seja maior, fora do volume de interação do laser usado, e isso deve ser levado em conta para uma proposta mais realista de medidas espectroscópicas.

Os espectros obtidos no Raman portátil foram mais ruidosos que os obtidos com o sistema de bancada, mas como o carotenoide apresenta efeito de Raman ressonante com o laser 532 nm, há um aumento significativo na intensidade do sinal das bandas do mesmo, compensando essa limitação. Atualmente é o melhor candidato a ser enviado ao planeta Marte para a busca de bioassinaturas como os carotenoides, mas há pontos negativos, especialmente em substratos com forte absorção nessa região espectral, como os ricos em óxidos e oxi-hidróxido de ferro. Neste caso, o laser no NIR pode apresentar ligeira vantagem, mesmo sem o efeito ressonante. Em qualquer um dos casos, deve-se levar em conta que, neste trabalho, foram analisados apenas substratos puros. Quando há traços de outros elementos, como terras raras, podem acontecer efeitos de luminescência que poderiam produzir emissões intensas capazes de mascarar o sinal de eventuais biomoléculas. Novamente, o substrato tem um papel muito ativo na capacidade de detecção de bioassinaturas por métodos espectroscópicos.

Com a técnica de reflectância tanto em bancada como a baseada em fibra óptica na linha de luz TGM do LNLS, foi possível monitorar a intensidade da banda de absorção ca. 520 nm para caracterizar a degradação da biomolécula *in situ* durante a simulação espacial usando a radiação síncrotron.

Comparando os resultados das medidas de absorção no UV-Vis (por reflectância difusa) com Raman, estes se mostraram concordantes e complementares, o que indica que a associação dessas duas técnicas espectroscópicas relativamente simples e robustas pode ser feita para dar mais confiança à interpretação dos resultados para medidas *in situ*.

Em relação às medidas de reflectância de bancada com a esfera integradora e as obtidas através de um sistema com fibra óptica e espectrômetro na linha TGM do LNLS, observamos que as medidas na linha de luz apresentaram uma pior razão sinal/ruído, pois a esfera integradora soma todo o sinal refletido da amostra, enquanto a fibra óptica capta apenas uma fração do

ângulo sólido total da luz refletida. Mesmo com essa limitação, foi possível obter informação suficiente para caracterizar a degradação do material biológico *in situ* durante a simulação espacial usando radiação síncrotron. A metodologia desenvolvida poderá ser aplicada para outros experimentos que tenham interesse em analisar a alteração de materiais *in situ* e em tempo real nas simulações, com outras biomoléculas ou materiais, inclusive de interesse em aplicação tecnológica.

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.