Universidade de São Paulo
Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas
Departamento de Astronomia

Luander Bernardes

A Terra como um Exoplaneta

São Paulo
2019

Luander Bernardes

A Terra como um Exoplaneta

Tese apresentada ao Departamento de Astronomia do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Astronomia
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Janot Pacheco

Versão Corrigida. O original encontra-se disponível na Unidade.

São Paulo

2019

A minha família e amigos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Eduardo Janot Pacheco, pela orientação e paciência na conclusão deste trabalho.

À professora Cláudia Alencar Lage pelas conversas, orientações e apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À professora Kumiko Koibuchi Sakane por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pelas orientações.

À professora Tie Koide por ter disponibilizado o seu laboratório às minhas pesquisas e pela confiança.

Ao professor Carlos Alberto Tellez Soto por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pelas orientações.

Ao amigo João Paulo Pereira de Almeida pela amizade sincera, ajuda e conversas.

À minha amiga Silvia Helena Epifânio pela humildade, incentivo e ajuda.

À minha mãe, avó e irmã por sempre terem sido tão carinhosas e atentas comigo.

Aos professores do departamento de Astronomia pela sólida formação.

À minha família pelo apoio e compreensão.

À minha namorada Michele Lidiane da Silva pelo companherismo e ajuda.

Aos meus amigos pelo incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Astronomia que contribuíram de várias maneiras para meu bem estar.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

Esta tese/dissertação foi escrita em LaTeX com a classe IAGTESE, para teses e dissertações do IAG.

"*No edifício do pensamento não encontrei nenhuma categoria na qual pousar a cabeça. Em contrapartida, que belo travesseiro é o Caos!*"

Emil Michel Cioran

"*Conhecer é tarefa de sujeitos, não de objetos. E é como sujeito e somente enquanto sujeito, que o homem pode realmente conhecer.*"

Paulo Freire

Resumo

É notório o fato de que o interesse pela detecção de vida fora da Terra tenha aumentado no mundo científico. A existência de possíveis traçadores biológicos na atmosfera terrestre, a presença de material vivo ou de material orgânico decomposto em superfícies e no mar aumentam as possibilidades de sucesso das pesquisas. A vida na Terra é encontrada em todas as partes, e o planeta está saturado de suas manifestações.

O objetivo da presente tese é o desenvolvimento de uma metodologia que ofereça ideias para a detecção de bioassinaturas fora da Terra, particularmente em exoplanetas. Em termos de biologia molecular, a principal assinatura de vida é o DNA (ácido desoxirribonucleico), que organiza e sedia o código genético de todos os seres vivos. Outras moléculas que denunciam a presença de vida são a clorofila, carotenoides, fragmentos de DNA, moléculas orgânicas, etc.

Na tentativa de se encontrar bioassinaturas na atmosfera de exoplanetas, um requisito deve ser atendido: a identificação de bandas características que permitam a detecção de um sinal que esteja associado a uma biomolécula complexa, preferencialmente na região do infravermelho, vista em meio aos picos de gases atmosféricos. Sendo assim, uma série de análises espectrais foram realizadas para amostras de DNA/células do micro-organismo extremófilo *Halobacterium salinarum*, com a finalidade de serem comparadas ao espectro infravermelho, obtido de forma direta da atmosfera terrestre. A pesquisa por marcadores específicos foi realizada a fim de determinar os picos que permitam a detecção desses componentes singulares quando suspensos em gases atmosféricos.

Os resultados da pesquisa mostram que a atmosfera terrestre está contaminada com moléculas complexas. Existem 37 absorções em comum quando se compara o espectro da atmosfera terrestre com os espectros de células ou DNA (por exemplo 966, 936, 924,

886 e 866 cm^{-1}). Entre elas, os picos centrados em aproximadamente 1018, 996, 900 e 840 cm^{-1}, denunciam a presença de estruturas biogênicas ligadas à presença de ácidos nucleicos (riboses e grupos fosfatos).

Investigou-se, também, a possibilidade de certas assinaturas biológicas serem mascaradas pela presença de gases quando observadas remotamente. A conclusão é que as bandas de gases como o SO_2 (1136 cm^{-1}), O_3 (1042 e 1124 cm^{-1}) e C_2H_6 (826 cm^{-1}), podem tornar a detecção de algumas bioassinaturas uma tarefa árdua e até mesmo impossível.

Outras perguntas de pesquisa ligadas à determinação da quantidade mínima de material biológico capaz de oferecer um sinal que possa ser identificado e atribuído a um material biológico específico, assim como a possibilidade de determinação de uma banda de absorção apta a servir como fator de calibração foram abordadas. Conclui-se que há possibilidades de se detectar alguma característica biológica mesmo após diluições cobrindo 5 ordens de magnitude (variação de 760 a 0.076 $ng/\mu l$). A banda centrada em 893 cm^{-1} pode ser utilizada para futuras calibrações, pois responde linearmente com a variação da quantidade de material biológico.

O resultado da pesquisa mostrou que existem bandas moleculares em comum entre a atmosfera e o material biológico, sendo atribuídas a potenciais marcadores moleculares que, possivelmente, poderão ser detectados de forma remota em futuras missões espaciais.

Palavras-chave: bioassinaturas – espectroscopia no infravermelho – exoplanetas – DNA – extremófilos – atmosfera terrestre.

Abstract

It is notorious that interest in detecting life beyond Earth has increased in the scientific world. The existence of possible biological markers the terrestrial atmosphere, the presence of living material or organic material decomposed on surfaces and at the sea increase the chances of success of the research. Life on Earth is everywhere and the planet is saturated with its manifestations.

The objective of this thesis is the development of a methodology that offers ideas for the detection of bioassinatures outside the Earth, particularly in exoplanets. In terms of molecular biology, the main signature of life is DNA (desoxyribonucleic acid), which organizes and hosts the genetic code all of the living things. Other molecules that denounce the presence of life are chlorophyll, carotenoids, DNA fragments, organic molecules, etc.

In an attempt to find bioassinatures in the atmosphere of exoplanets, a requirement must be met: the identification of characteristic bands that allow the detection of a signal associated with a complex biomolecule, preferably in the infrared region, seen in the middle of the peaks of gases atmospheric conditions. Thus, a series of spectral analyzes were performed for DNA samples / cells of the extremophilic microorganism *Halobacterium salinarum*, to be compared to the infrared spectrum obtained directly from the Earth's atmosphere. The search for specific markers was performed in order to determine the peaks that allow the detection of these singular components when suspended in atmospheric gases.

The results of the research show that the Earth's atmosphere is contaminated with complex molecules. There is a total of 37 common absorptions found in the spectrum of the Earth's atmosphere and in Cells or DNA spectra (for example 966, 936, 924, 886 and 866 cm^{-1}). Among them, the peaks centered at approximately 1018, 996, 900 and 840

cm^{-1}, denote the presence of biogenic structures linked to the presence of nucleic acids (riboses and phosphate groups).

It was also investigated the possibility of certain biological signatures being masked by the presence of gases when observed remotely. The conclusion is that gas bands such as SO_2 (1136 cm^{-1}), O_3 (1042 and 1124 cm^{-1}) and C_2H_6 (826 cm^{-1}) can make the detection of some bioassinatures a difficult task.

Other research questions related to the determination of the minimum quantity of biological material can providing a signal capable of being identified and assigned to a specific biological material, as well as the possibility of determining an absorption that could a serving as a calibration factor were addressed . It is concluded that it is possible to detect a same biological characteristic after dilutions covering 5 orders of magnitude (ranging from 760 to 0.076 ng/l). The band centered at 893 cm^{-1} can be used for future calibrations because it responds linearly with the variation of the amount of biological material.

The research results showed that there are molecular bands in common between the atmosphere and biological material and are attributed to potential molecular markers that may possibly be detected remotely in future space missions.

Keywords: bioassinatures - infrared spectroscopy - exoplanets - DNA - extremophiles - terrestrial atmosphere.

Lista de Figuras

1.1 Principais características dos exoplanetas catalogados até o momento. A figura (a) mostra a relação entre a densidade e o raio; a figura (b), a relação entre a excentricidade e o período dos exoplanetas; a figura (c) aponta a relação entre o raio e o período e a figura (d) a relação entre o raio e a temperatura de equilíbrio. Fonte: `https://exoplanetarchive.ipac.caltech.edu/exoplanetplots/`. Acesso: em out. 2018. 25

1.2 Esquema geral contextualizando o projeto e seus desdobramentos. 32

2.1 Isolamento de micróbios na atmosfera. A porção hachurada corresponde a altitude em que os micro-organismos foram coletados. A primeira coluna indica a altitude onde partículas de poeira foram coletadas. Fonte: (Imshenetsky et al., 1978). 35

2.2 Simulação da concentração (10^3 m^{-3}) da distribuição de bactérias (1 μm) no ar próximo a superfície. Fonte: Burrows et al., 2009. 39

2.3 Espectro visível e no infravermelho próximo detectado pela sonda *Galileo* em 1990. Neles, pode-se observar algumas bandas de CO_2, vapor de água, N_2O, O_3 e CH_4. Fonte: Sagan et al., 1993. 41

2.4 Provável cenário de ejeção e busca de sinais biológicos na atmosfera terrestre. Fonte: baseado em Burrows et al., 2009. 42

3.1 Espectro eletromagnético. Fonte: Madigan et al., 2003. 44

3.2 Modos de vibração e representação da energia oriundas da absorção da radiação infravermelha. 45

3.3 Localização espectral de grupos funcionais na faixa do infravermelho médio. Fonte: adaptado de Wade, 2012. 47
3.4 Laboratório de espectroscopia e representação do aparato e das técnicas experimentais utilizadas nas medidas. Fonte: baseado em Alvarez-Ordóñez e Prieto, 2012. 49
3.5 Espectro no infravermelho da molécula de DNA de um micro-organismo, mostrando algumas bandas características como as da Amida I e Amida II. O DNA desse micro-organismo faz parte de uma biblioteca oriunda deste projeto. 54
3.6 Espectro no infravermelho de células suspensas de um micro-organismo extremófilo, mostrando algumas bandas características como as da Amida I e Amida II. O espectro desse micro-organismo faz parte de uma biblioteca oriunda deste projeto. 55

4.1 Eventos de bombardeamento ocorridos no passado e explicados a partir de dados lunares. Fonte: Zahnle et al., 2007. 60
4.2 Evolução da complexidade biológica. Fonte: Madigan et al., 2003. 62
4.3 Evolução da biosfera terrestre. Em (a) destaca-se a evolução do planeta e a oxigenação da atmosfera. Em (b) aponta-se a diferenciação dos organismos terrestres a partir de um ancestral comum. Fonte: baseado em Madigan et al., 2003. 63
4.4 Características dos micro-organismos extremófilos e nichos terrestres (localidades onde existem temperaturas elevadas, alta salinidade, alta pressão, vasta faixa de pH e temperaturas baixas) e extraterrestres (Marte e Luas como Titã, Europa, Io e Encedalus) onde eles poderiam sobreviver. Fonte: baseado em Madigan et al., 2003. 65
4.5 *Halobacterium salinarum* e nichos salinos onde elas são encontradas. Fonte: `http://www.biochem.mpg.de/522218/Org_Hasal`. Acesso em 10 jul. 2018. 67

4.6 Ambientes dentro do Sistema Solar onde possivelmente há condições para a existência de micro-organismos halofílicos. A figura à esquerda aponta locais em Marte onde foi reportado indícios da provável presença de gelo, água ou sal. A figura à direita mostra jatos contendo particulados de gelo sendo emitidos pelo satélite natural Encedalus. Fonte: `https://mars.nasa.gov/resources/3578/ice-salt-and-warm-season-flows-on-mars/` e `https://www.nasa.gov/feature/jpl/enceladus-jets-surprises-in-starlight`. Acesso 10 jun. 2018. 68

5.1 Espectro das amostras biológicas contendo DNAs e células suspensas dos micro-organismos *Haloferax sp.* e *Deinococcus radiodurans*, além dos espectros do quartzo e da água. 73

5.2 Junção dos espectros dos DNAs e células suspensas dos micro-organismos *Haloferax sp.* e *Deinococcus radiodurans* mais os espectros da água e do quartzo. 74

5.3 Espectro de Absorbância de algumas amostras biológicas contento DNA do micro-organismo *Halobacterium salinarum* purificado e em diversas concentrações ($600 - 4000\ cm^{-1}$). 75

5.4 Espectro de absorbância de amostras biológicas contento DNA de alguns micro-organismos estudados nesta pesquisa. O método utilizado para a realização do espectro foi FTIR-ATR. 76

5.5 Esquema dos procedimentos experimentais adotados para obtenção dos espectros dos micro-organismos. 78

5.6 Interseção dos espectros de DNA do micro-organismo *Halobacterium salinarum* obtidos pelas técnicas FTIR, FTIR-ATR e microespectroscopia (transmissão). 79

5.7 Espectros das soluções aquosas e salinas utilizadas nos experimentos. . . . 80

5.8 Espectro da atmosfera terrestre. (a) Espectro da atmosfera terrestre com destaque para a região espectral do ozônio. (b) Testes de primeira e segunda derivadas aplicadas ao espectro. 82

5.9 Espectro da atmosfera terrestre. (a) Teste de segunda derivada de parte do espectro terrestre. (b) Deconvolução por aproximação Gaussiana. 83

5.10 Espectro infravermelho normalizado de DNA e células suspensas da archaea *Halobacterium salinarum*. Espectros obtidos a partir de microfilmes de (a) céluas inteiras e (b) DNA purificado. 86
5.11 Espectro de 30 μl de solução contendo 540 $ng/\mu l$ de DNA da archaea *Halobacterium salinarum*. 87
5.12 Espectro de 30 μl de solução contendo células suspensas da archaea *Halobacterium salinarum* ($D.O.600nm = 0.5$). 88
5.13 Comparação entre os espectros de células suspensas e DNA da archaea *Halobacterium salinarum*. (a) Espectro infravermelho, mostrando as absorções dos principais grupos funcionais moleculares presentes nas amostras. (b) Teste de segunda derivada de cada espectro. Várias bandas podem ser identificadas por meio deste método. 91
5.14 Espectro da atmosfera terrestre versus o espectro de material biológico oriundo da archaea *Halobacterium salinarum*. (a) Atmosfera versus DNA; (b) Atmosfera versus células suspensas. 93
5.15 Região de *fingerprint*. (a) Semelhanças entre o espectro da archaea e do céu. (b) Teste de segunda derivada identificando os picos de absorção semelhantes. 94
5.16 Diagrama de Venn comparando a faixa dos três espectros estudados, assim como a sua correlação com os modos vibracionais de moléculas biológicas. . 95
5.17 Gradiente de concentração de DNA purificado do micro-organismo *Halobacterium salinarum* por meio da técnica de FTIR-ATR. 98
5.18 Análise de Componentes Principais para o gradiente das amostras, contendo DNA purificado da archaea *Halobacterium salinarum*. Em (a) é mostrado que somente duas componentes são necessárias para explicar a variabilidade dos dados (PC1 e PC2); em (b) a formação de grupos distintos. Finalmente em (c), apontam-se quais são os principais picos que caracterizam PC1 e PC2 quando escolhemos como referência o espectro mais concentrado. . . . 99
5.19 Aplicação da técnica matemática de Análise por *Cluster* para os espectros da *Halobacterium salinarum*. 100
5.20 Espectro de DNA purificado da *Halobacterium salinarum* mostrando as possíveis candidatas a bandas de calibração. 101

5.21 Regressão linear para a banda de 893 cm^{-1} presente no espectro da archaea *Halobacterium salinarum*. 103

5.22 Aponta-se aqui, os trabalhos realizados na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que tinham como objetivo construir, testar e garantir certos parâmetros mínimos dos materiais específicos embarcados na sonda (peças e filtros). Em (a) aponta-se peças construídas para proteger os filtros. Já em (b) destaca-se o processo de esterilização de algumas peças embarcadas na sonda. Em (c) aponta-se o processo de esterilização dos filtros. Em (d) os testes mecânicos em baixas temperaturas. 105

5.23 Voo da sonda suborbital. Destaca-se o processo de montagem da estrutura, o voo e recuperação da carga embarcada. Em (a) é mostrado a montagem, o processo de esterilização e a preparação para o voo. Já em (b) mostra-se o voo, seu acompanhamento e a recuperação da carga. 106

B.1 Montagem da sonda suborbital e os métodos utilizados para a análise do conteúdo da atmosfera terrestre. 131

Lista de Tabelas

2.1 Dimensão dos principais constituintes dos PBAPs. Fonte: Macher (1993). . 37

2.2 Estimativa média da quantidade de bactérias presentes próximas à superfície terrestre e em vários ecossistemas terrestres (m^{-3}). Fonte: b - Harrison et al., 2005; c - Lighthart (1997); d - Shaffer e Lighthart (1997); e - Tong (1999) e Tilley et al., 2001; f - Bauer et al., 2002; g - Griffin et al., 2006. . . 38

2.3 Estimativa populacional de micro-organismos adaptados a ambientes que apresentam baixas temperaturas. 39

3.1 Características do equipamento utilizado na aquisição dos dados. 48

3.2 Principais valores de absorção para materiais biológicos. Fonte: Stuart, 2006. 53

4.1 Classe de alguns organismos terrestres (incluindo os micro-organismos extremófilos), principais características de sobrevivência e ecossistemas onde são encontrados. 66

5.1 Micro-organismos selecionados para estudo. 72

5.2 Principais características das amostras preparadas no Instituto Oceanográfico para a realização das análises espectroscópicas. 72

5.3 Concentrações de algumas amostras contendo DNA extraídos e purificados do micro-organismo *Halobacterium salinarum* (trabalho realizado em colaboração com a FMRP-USP). 77

5.4 Deconvolução de parte do espectro da atmosfera terrestre por meio de aproximação Gaussiana. A região espectral analisada compreende o intervalo de 1093 a 961 cm^{-1}. 84

5.5 Principais bandas encontradas em materiais biológicos (DNA, células suspensas e tecidos). Aqui, utilizou-se as seguintes convenções: ν, estiramento; δ, dobramentos; Υ, *wagging, twisting* e *rocking*; def, deformação; as, assimétrico; s, simétrico. Dados baseados em Wood (2016). 85
5.6 Valores de absorção obtidos a partir dos espectros do DNA, de células suspensas e da atmosfera. 92
5.7 Principais bandas atmosférica no infravermelho atribuídas a gases atmosféricos e a água. Fonte: Catling et al., 2018. 96
5.8 Possíveis atribuições a bandas encontradas nos espectros de materiais biológicos, assim como no espectro da atmosfera terrestre. Destacam-se as transições envolvendo grupos fosfato e que denunciem a presença de ácidos nucleicos. 97
5.9 Valores de intensidade versus valores de concentração para as diversas amostras do micro-organismo *Halobacterium salinarum*. Os dados referem-se à banda marcadora de 893 cm^{-1}. 102

A.1 Principais valores de bandas marcadoras atribuídas a moléculas de lipídeos. Baseada em Stuart (2004). 126
A.2 Principais valores de bandas marcadoras atribuídas a amidas de proteínas. Baseada em Stuart (2004). 127
A.3 Principais valores de bandas marcadoras atribuídas a aminoácidos. Baseada em Stuart (2004). 127

Sumário

1. Introdução 23

1.1 Exoplanetas, habitabilidade e bioassinaturas 24

1.2 Biosfera terrestre 26

1.3 Panspermia, bactérias e vírus na atmosfera terrestre 28

1.4 A atmosfera terrestre 30

1.5 Objetivo da pesquisa 31

2. A Terra: um planeta habitável 33

2.1 Atmosfera como um ambiente habitável 33

2.2 Dispersão de material biológico 36

2.3 A Terra vista como um exoplaneta 40

3. Espectroscopia vibracional 43

3.1 Espectroscopia de biomoléculas 43

3.2 Aparato experimental e o objetivo das medidas 47

3.3 Modos vibracionais de moléculas de interesse astrobiológico 51

3.4 Técnicas matemáticas e tratamento de dados 55

4. Micro-organismos extremófilos 59

4.1 Terra primitiva 59

4.2 Extremófilos terrestres 64

4.3 *Halobacterium salinarum* 66

4.4 Habitabilidade e organismos halofílicos 67

5. Resultados e discussões 71
5.1 Objetivos dos experimentos 71
5.2 Escolha do micro-organismo utilizado como referência nesta pesquisa . . . 71
5.3 Testes preliminares e definição da metodologia experimental 72
5.4 Análise da atmosfera terrestre 80
5.5 Caracterização espectral do micro-organismo *Halobacterium salinarum* . . 86
5.6 Comparação do espectro atmosférico com o espectro do micro-organismo Halobacterium salinarum 93
5.7 Determinação de bandas de calibração 97
5.8 Exposição de objetivos e procedimentos experimentais secundários 104

6. Conclusão 107

Referências 111

Apêndice 123

A. Caracterização espectroscópica de lipídeos e proteínas 125

B. Experimentos atmosféricos - sonda suborbital 129
B.1 Preparação do módulo de coleta do material atmosférico 129
B.2 Coleta dos materiais 129
B.3 Análise das amostras 131

Capítulo 1

Introdução

Desde a confirmação da existência de exoplanetas orbitando estrelas da Sequência Principal (Mayor e Queloz, 1995), um grande esforço tem sido realizado pela comunidade científica com objetivo de compreendê-los e verificar a possibilidade da presença de vida além da Terra. Vários modelos teóricos de habitabilidade planetária foram propostos (Kasting et al., 1993; Kopparapu et al., 2013) ao mesmo tempo em que ações, na busca de avanços tecnológicos que permitam um melhor estudo desses corpos celestes, foram idealizadas (Pham et al., 2018). Entretanto, os modelos teóricos apresentados são apenas aproximações da realidade e apresentam uma variabilidade grande de resultados quando submetidos a alterações de determinados parâmetros como, por exemplo, o conteúdo atmosférico. Eles também não abordam de maneira satisfatória a possibilidade de haver algum tipo de vida mais exótica como a extremófila, ou seja, na maioria das vezes são modelos baseados na visão antrópica. Em um contexto mais complexo, pode-se considerar apenas boas alternativas na seleção de regiões de maior probabilidade para a ocorrência de candidatos a planetas habitáveis, mas não uma garantia da existência de vida neles.

Em breve, com o avanço das técnicas observacionais e com o desenvolvimento de novas tecnologias, será possível detectar e estudar o conteúdo das atmosferas de exoplanetas, identificando algumas bioassinaturas que podem sugerir a presença de vida tais como a H_2O, O_2, O_3, CO_2 e o CH_4. Apesar disso, mesmo que a detecção desses gases seja confirmada, não se pode afirmar que o planeta em questão abriga vida, pois tais marcadores não são prova irrefutáveis da existência dela. Esta tese tem como objetivo tomar a Terra e a sua bioesfera como um modelo e verificar a viabilidade de um caminho alternativo na busca de sinais de vida extraterrestre com a argumentação de que a escolha de um conjunto de biomarcadores específicos (DNA e células suspensas de micro-organismos) e a análise

das atmosferas planetárias possa levar a conclusões mais robustas sobre a habitabilidade planetária.

1.1 Exoplanetas, habitabilidade e bioassinaturas

A constatação de que a existência de planetas fora do Sistema Solar é comum motivou a busca por metodologias capazes de, em um futuro próximo, analisar suas atmosferas de forma remota. No entanto, uma busca não muito criteriosa por sinais que possam denunciar a presença de vida pode potencializar o insucesso ou levar a conclusões equivocadas. Alguns fatores como, por exemplo, o tipo espectral da estrela hospedeira, a composição química do planeta, sua posição orbital e a sistematização de bioassinaturas terrestres são importantes na seleção dos principais alvos e na análise das características dos dados obtidos.

O avanço das técnicas observacionais revelou uma vasta e diversificada quantidade de exoplanetas. Pode-se argumentar que o interesse astrobiológico está centrado, primeiramente, em planetas rochosos e que estejam localizados em distâncias orbitais compatíveis com a definição de Zona Habitável, ou seja, em regiões onde a presença de água no estado líquido é possível (Kasting et al., 1993). Essa exigência é baseada no fato de que a vida na Terra se desenvolveu na presença desse solvente; porém, ao se pensar em micro-organismos extremófilos, esse limite pode ser estendido a regiões além da Zona Habitável. Alguns corpos celestes como luas e planetas, que estejam ocupando uma posição fora do limite compreendido atualmente como o ideal, podem se tornar objetos interessantes de estudo (Bernardes, 2013).

As análises dos dados observacionais revelam que a maioria dos planetas com períodos orbitais de aproximadamente 100 dias, possuindo raio abaixo do intervalo compreendido entre 1.5 e 2 raios terrestres, deve apresentar uma composição do tipo rochosa/metálica; já os planetas mais massivos e com períodos semelhantes se enquadram na classe dos denominados gigantes gasosos. Nota-se, também, que há um conjunto de possíveis planetas com raio menor que 1.5 e maior que 2 raios terrestres, que ainda não foram devidamente estudados (Weiss e Marcy, 2014; Rogers, 1936; Kaltenegger, 2017; Fulton e Mitchell, 1966). A figura 1.1 mostra algumas das principais características dos exoplanetas detectados até o momento.

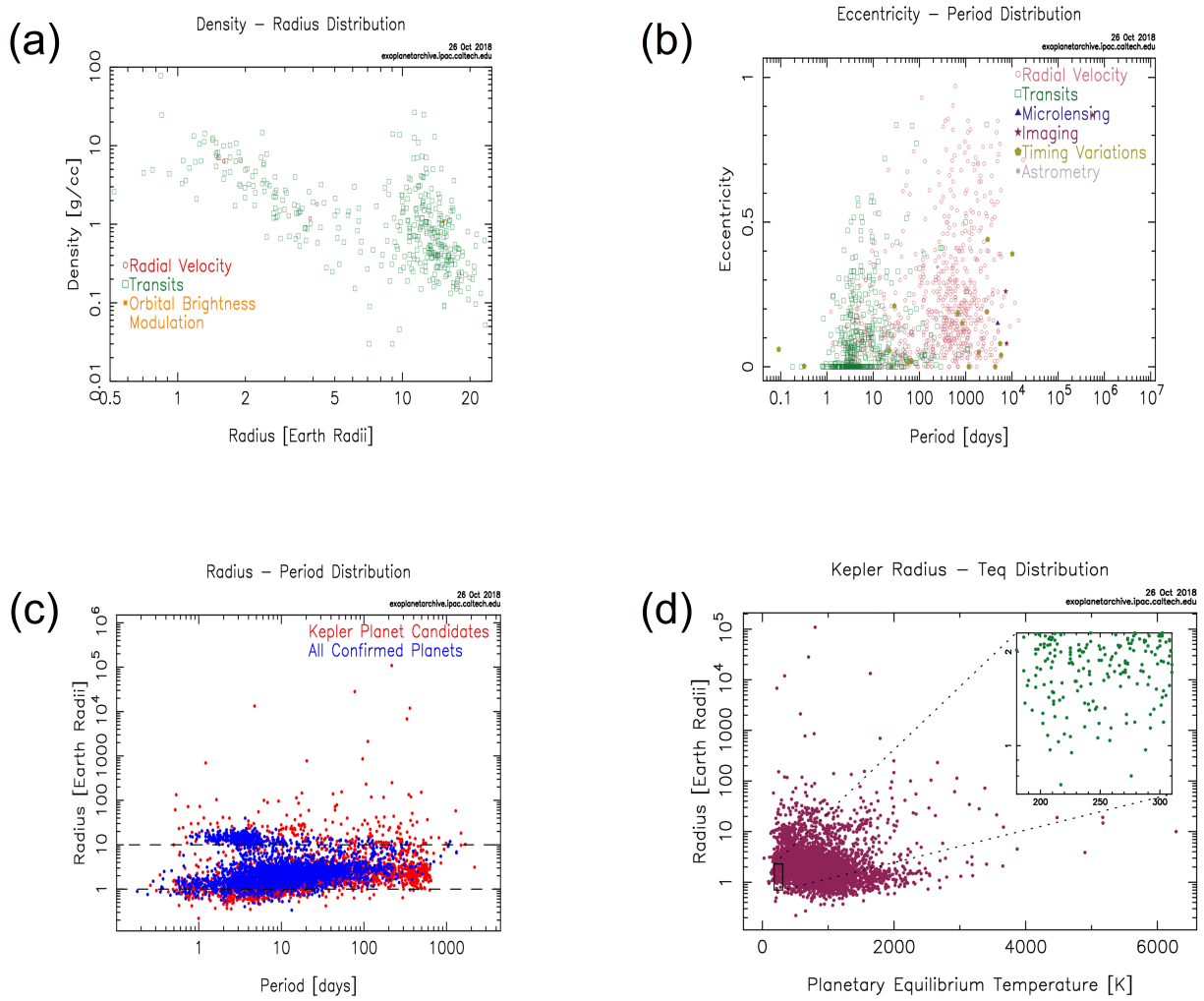

Figura 1.1: Principais características dos exoplanetas catalogados até o momento. A figura (a) mostra a relação entre a densidade e o raio; a figura (b), a relação entre a excentricidade e o período dos exoplanetas; a figura (c) aponta a relação entre o raio e o período e a figura (d) a relação entre o raio e a temperatura de equilíbrio. Fonte: `https://exoplanetarchive.ipac.caltech.edu/exoplanetplots/`. Acesso: em out. 2018.

Segundo Kaltenegger (2017), as evidências observacionais recentes apontam que exoplanetas rochosos possuindo envoltórios gasosos ideais para análise futura estão concentrados em uma faixa bem específica, caracterizada por meio da razão entre o seu raio e a sua massa. Em termos de ordem de grandeza, os planetas mais propensos a possuir uma atmosfera semelhante à terrestre seriam aqueles com raio de até dois raios terrestres e com massa aproximada de até dez massas terrestres.

Considerando a vizinhança em torno do Sistema Solar, apontam-se alguns exoplanetas como potenciais alvos na tentativa de acesso a informações sobre os possíveis envoltórios gasosos extrasolares: o planeta Proxima Centauri b, que é um objeto com a massa compa-

rada à da Terra, localizado 1.3 *parsecs* de distância e que recebe um fluxo radioativo da ordem de 65% do fluxo recebido pela Terra (Anglada-Escudé et al., 2016) e o corpo celeste GJ 273 b, que é outro planeta extrasolar com massa um pouco maior do que a terrestre, localizado 3.8 *parsecs* e que recebe um fluxo radioativo semelhante ao recebido pela Terra (Astudillo-Defru et al., 2017).

Existem ainda sete planetas semelhantes à Terra orbitando uma estrela fria denominada TRAPPIST-1 a 12 *parsecs* de distância, sendo que, dentre eles, quatro astros podem prover condições para o aparecimento e desenvolvimento da vida (Gillon et al., 2017). Finalizando os possíveis candidatos a planetas habitáveis nas "redondezas" do Sistema Solar, cita-se ainda o exoplaneta LHS 1140 b, um planeta terrestre grande localizado a 12 *parsecs* de distância (Dittmann et al., 2017).

Nas próximas décadas, inúmeros estudos a respeito de temas relacionados à caracterização da habitabilidade por meio da análise atmosférica dos exoplanetas serão possíveis graças ao lançamento de uma nova geração de telescópios espaciais, assim como ao avanço das técnicas de observação a partir de equipamentos instalados em solo (Fujii et al., 2018). Ratifica-se, porém, o cuidado na interpretação dos dados obtidos por meio dessas diversas formas de observação, pois alguns gases utilizados como indicadores da presença de vida podem ser produzidos por meio de vias correlacionadas a eventos geológicos (atividades vulcânicas), à evolução do sistema planetário (*runaway greenhouse effect*), à colisão de corpos externos, etc (Catling et al., 2018). Assim, a identificação de componentes que denunciem a presença de DNA ou de células de organismos pode fortalecer o modo de caracterização dos planetas extrasolares.

1.2 Biosfera terrestre

O planeta Terra regurgita vida, sobretudo microbiana, e em qualquer região onde se colha uma amostra de conteúdo líquido, sólido ou gasoso há presença de material vivo ou, pelo menos, orgânico decomposto, possibilitando a constatação da presença de bioassinaturas. Isso é válido no interior de rochas, nos mares e na atmosfera terrestre (Vázquez et al., 2010; Yang et al., 2009). A detecção direta de sinais de vida no planeta já foi feita, também remotamente, por meio de satélites e/ou missões espaciais como no *flyby*, executado na Terra pela sonda *Galileu* em seu caminho para o sistema de Júpiter (Sagan et al.,

1993). Acrescentam-se, normalmente, às bioassinaturas ou até mesmo incluem-se nelas as chamadas impressões digitais (*fingerprints*) espectrais de vida, que são as bandas de CO_2, H_2O e O_3. Porém, somente essas assinaturas não são provas irrefutáveis da presença de vida em um planeta e se pode apontar, por exemplo, o que ocorre em Marte e Vênus, que apresentam fortes bandas de CO_2, mas não aparentam abrigar vida. A constatação de H_2O na atmosfera também só indica a possibilidade de haver vida no planeta, ou seja, não é o conteúdo biótico que a enriquece com vapor de H_2O; sabe-se que, provavelmente, foram as bactérias que enriqueceram o ambiente terrestre com O_2 a partir de aproximadamente três bilhões de anos, mas não de H_2O (Catling et al., 2018). Em relação ao O_3, acreditava-se que sua origem estaria ligada à atividade biótica, entretanto, alguns modelos químicos apontam a possibilidade da formação dessa molécula sem a presença de vida.

Na busca de vida extraterrestre, o único paradigma de planeta habitado que se tem até o momento é a Terra. Milhares de planetas extra-solares foram descobertos até hoje, sendo que alguns estão nas Zonas Habitáveis de suas estrelas (Batalha, 2014). Parece óbvio ser uma questão de tempo para que se atinja a competência tecnológica de detecção das assinaturas espectrais da eventual presença de vida em atmosferas de planetas telúricos e esta tese tem como finalidade contribuir significativamente para isso. O propósito último dela é contribuir para o encontro de uma metodologia que colabore com o tema da detecção de bioassinaturas fora da Terra, particularmente em exoplanetas. Deste modo, foram utilizados, para tal finalidade, experimentos baseados em evidências terrestres: a vida no planeta está em todas as partes e ele está saturado de suas manifestações. Em termos de biologia molecular, a principal assinatura de vida é o DNA, que organiza e sedia o código genético de todos os seres vivos. Outras moléculas que denunciam a presença de vida são a clorofila, carotenóides e partes do DNA. Por outro lado, micro-organismos (bactérias, archaeas e vírus) têm sido detectados na atmosfera em várias altitudes (Yang et al., 2009). Surpreendentemente, as principais transições de DNA e componentes são pouco conhecidas pelos astrônomos e um levantamento sistemático e homogêneo deles é uma tarefa muito importante.

Inicialmente, para atender às necessidades do projeto, foi montado um aparato experimental estrategicamente situado nos laboratórios de pesquisas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Neles, foram preparados esquemas de medidas para o estudo da interação de moléculas de DNA

com a radiação, considerando diversas condições e concentrações, isto é, em estado livre e sob a forma de micro-organismos (células suspensas). Os laboratórios possuem estrutura para a realização de procedimentos de crescimento de culturas de organismos, purificação e extração de DNA, assim como análise no infravermelho dos materiais biológicos selecionados de acordo com as necessidades do projeto (DNA, células suspensas, carotenóides, etc).

Todo material biológico foi preparado no laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e transportado até os laboratórios da UNIVAP. As principais transições dos materiais biológicos em questão ocorrem no infravermelho médio, e há laboratórios na UNIVAP equipados com espectrofotômetros adequados para medi-las. Paralelamente, espectros de algumas partes do DNA, como as nucleobases, estão sendo calculados por químicos quânticos da Universidade Nice Sophia Antipolis (UNS), colaboradores desta pesquisa. Os cálculos são realizados por meio de simulações computacionais, cuja tarefa, muito complexa, depende criticamente das condições físicas e químicas de onde as substâncias se encontram (Adrian-Scotto et al., 2010). Esses cálculos poderão ser ajustados via cotejo com as medidas de laboratório de espectroscopia realizadas neste trabalho.

Ainda dentro do escopo do projeto, foi planejado o lançamento de uma sonda suborbital, cujo o objetivo era recolher e sistematizar informações sobre as concentrações de vírus, bactérias, archaeas, DNA e moléculas biológicas, que possivelmente estão espalhados pela alta atmosfera terrestre. Essa atmosfera será, pois, usada como um laboratório, visando uma extrapolação para condições semelhantes em atmosferas exoplanetárias a serem exploradas a partir de futuras missões espaciais, onde medidas poderão ser feitas por fotometria (absorbância devida a moléculas-chave) e espectroscopia (detecção de bandas dessas moléculas).

1.3 Panspermia, bactérias e vírus na atmosfera terrestre

A ideia geral dessa pesquisa considera que o material biológico presente na atmosfera terrestre é oriundo do próprio planeta. Mas será que esse conteúdo poderia ter sido incorporado à atmosfera por meio de fontes externas? O filósofo pré-socrático grego Anaxágoras (510 – 428 $a.C.$) instituiu pela primeira vez a doutrina da panspermia (pan = todo e

sperma = semente), segundo a qual "os germes etéreos da vida", isto é, substâncias espermáticas invisíveis, disseminadas em todos os mundos que nos cercam, dão nascimento a todos os seres vivos, inclusive ao homem. Desenvolvida também por filósofos romanos e neo-platônicos a partir do século III *d.C.*, a panspermia foi adotada pelos primeiros cristãos e até por Santo Agostinho, que escreveu que o mundo inteiro está cheio de germes ocultos de vida, as secretas sementes invisíveis (oculta semina), que da terra, do ar e da água fariam gerar os diversos seres vivos. Num contexto mais astronômico, essas ideias de disseminação de vida pelo Universo foram retomadas por Arrhenius no início do século XX (Arrhenius, 1908) e por muitos outros desde então (Crick, 1981).

Sabemos que materiais terrestres contaminados com micro-organismos podem ser transportados até a alta atmosfera por ventos, erupções vulcânicas ou impactos de meteoritos, podendo eventualmente atingir a velocidade de escape e serem ejetados do planeta (Napier, 2004). Se os micróbios descritos são capazes de resistir às condições físicas e de radiação fora da atmosfera, poderão contaminar outro planeta, num processo de disseminação de vida pela Galáxia. O mesmo ocorreria, obviamente, com material de outro planeta que pode chegar até a Terra, formando um ciclo de panspermia. De fato, experimentos conduzidos no Laboratório Nacional de Luz Síncontron brasileiro, assim como em outros aceleradores e laboratórios europeus, sugerem claramente que a panspermia pode ocorrer, sendo os micrometeoritos um meio de transporte de micróbios viável (Paulino-Lima et al., 2010).

Napier (2004) mostrou que o material sólido ejetado da Terra por choques meteoríticos acabará fragmentado pelo efeito *Poynting-Robertson* (fenômeno relativístico de interação da luz sobre as partículas de poeira localizadas em órbitas estelares, que funciona como um freio, possibilitando um movimento em espiral desse conteúdo em direção à superfície da estrela) e ejetado do sistema planetário pelo vento solar podendo, portanto, ser um agente efetivo de panspermia na Galáxia. Seguindo esse raciocínio, nossa atmosfera poderia abrigar micro-organismos vindos de outras localidades do Sistema Solar ou até mesmo de regiões mais afastadas dentro da Galáxia. Além dessa possibilidade, moléculas biológicas complexas e até mesmo micro-organismos extremófilos podem existir em diversos nichos no espaço como, por exemplo, o meio interestelar, o meio interplanetário, os satélites naturais, os meteoritos e os cometas, onde as condições podem ser tão hostis quanto as de certas localidades terrestres. Sendo assim, o conhecimento de transições importantes de moléculas complexas como o DNA é uma ferramenta importante no contexto da Astrobiologia.

1.4 A atmosfera terrestre

Independentemente das considerações sobre panspermia, micro-organismos vêm sendo coletados na atmosfera terrestre em altitudes de até 80 km desde 1936 (Rogers, 1936). Numerosas coletas têm sido feitas desde então em várias altitudes e regiões do globo e com várias técnicas (Yang et al., 2009; Burrows et al., 2009; Kawaguchi et al., 2010; Pearce et al., 2009; Fulton e Mitchell, 1966). Foi mostrado que a presença de micro-organismos na atmosfera tem influência sobre o comportamento das nuvens, na química atmosférica e, eventualmente, na ocorrência de doenças na superfície do planeta (Burrows et al., 2009). Sabe-se, também, que bactérias e/ou archaeas coletadas até 41 km de altitude, isto é, acima da troposfera (região de influência da superfície terrestre), mostraram-se não cultiváveis em laboratório, sugerindo que elas possam ser de origem extraterrestre (Wainwright et al., 2004); vale ressaltar que essa discussão ainda continua em aberto.

Micróbios originários de plantações foram detectados com densidades várias vezes superiores às de regiões marinhas (Lindemann et al., 1982; Rasmussen e Went, 1965), estabelecendo uma clara correlação entre a presença de micro-organismos na alta atmosfera e de vida vegetal na superfície do planeta. Estima-se que exista em média pelo menos 10^5 m^{-3} micro-organismos na atmosfera terrestre (Burrows et al., 2009). Vírus foram também detectados, tendo sido constatadas variações sazonais em sua abundância, porém com certa uniformidade na distribuição geográfica (Clarke et al., 2002). Whon et al. (2012) estimaram uma concentração média anual de vírus na atmosfera de aproximadamente $2 \times 10^7 m^{-3}$. A presença de matéria orgânica sob a forma de aerossóis tem sido também corriqueiramente medida (Went, 1960; Ben-David e Ren, 2003). Todas essas medidas e estimativas mostram que a atmosfera terrestre é um ambiente contaminado com material orgânico de diversas origens e tipos.

Infelizmente, várias formas de medidas e unidades foram utilizadas até agora nas coletas e detecções do conteúdo orgânico presente na atmosfera como, por exemplo, partículas/volume, unidades formadoras de colônias, fluxo (m^{-2} s^{-1}), massa de carbono, densidade óptica, transmissividade, etc., dificultando a construção de relações objetivas entre elas.

1.5 Objetivo da pesquisa

A ciência de que a atmosfera terrestre é aparentemente um ambiente rico em material biológico faz com que a proposta da busca de vida fora do Sistema Solar se concentre no estudo das atmosferas planetárias, já que uma análise *in situ* é, hoje, tecnologicamente inviável. A detecção de biomoléculas (DNA, RNA, carotenóides, partes de DNA, etc.) ou mesmo de micro-organismos seria uma prova irrefutável da presença de vida em um planeta. Desse modo, o esforço dessa pesquisa se concentra no avanço da compreensão de como moléculas biológicas e micro-organismos podem se distribuir no envoltório gasoso que circunda o planeta e interagir com o ambiente ao seu redor, objetivando a idealização de meios para detecção de sua possível presença fora da Terra, mais especificamente, em exoplanetas semelhantes. Nesse contexto, foi feito um planejamento para se analisar o espectro da atmosfera terrestre em busca de indicadores que possam denunciar a possível presença de material biológico (bandas e picos característicos de DNA, RNA, células e seus constituintes).

A figura 1.2 mostra a idealização do conteúdo desta tese, assim como os futuros estudos que poderão ser desenvolvidos baseados nos resultados obtidos.

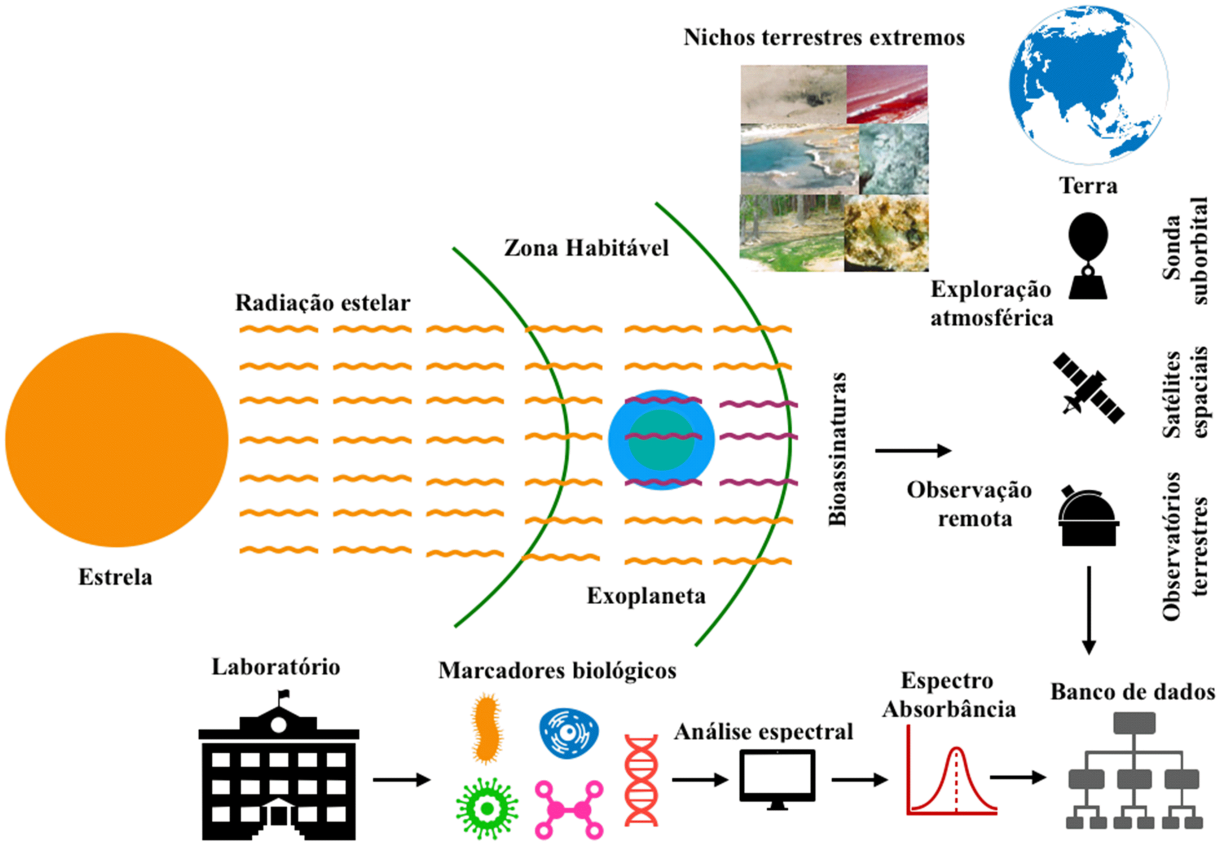

Figura 1.2: Esquema geral contextualizando o projeto e seus desdobramentos.

Em síntese, o projeto visa estudar o resultado da interação da luz proveniente de uma estrela e que interage com o material biológico presente na atmosfera de um exoplaneta. Para tal finalidade, montou-se uma estrutura de laboratórios capazes de preparar amostras biológicas (contendo células suspensas e DNA de micro-organismos extremófilos) e caracterizá-la espectroscopicamente. Além destes procedimentos, foi realizada a observação real de aproximadamente 30 km da atmosfera terrestre, assim como a idealização de experimentos que visam coletar amostras biológicas em diversas camadas do envelope gasoso terrestre. Para isso, uma sonda suborbital foi construída em colaboração com pesquisadores de outras instituições, visando realizar a coleta do conteúdo atmosférico em intervalos de 5 km a partir de uma altitude de 32 km. Todos os dados oriundos destas etapas serão cruzados com os dados obtidos em laboratórios, com a finalidade de se encontrar marcadores biológicos que denunciem a vida na Terra. Assim, será possível construir, ao longo do tempo, um banco de dados contendo as informações do conteúdo atmosférico terrestre para futura comparação com as atmosferas de exoplanetas potencialmente habitáveis.

Capítulo 2

A Terra: um planeta habitável

Em uma visão mais conservadora, um planeta para ser considerado habitável necessita estar localizado na denominada zona estelar habitável, isto é, uma região ao redor de sua estrela hospedeira onde as condições físico-químicas permitem a existência de água líquida. Porém, mesmo estando localizado no interior dessa região privilegiada, o planeta ainda pode ser inabitável se certos parâmetros intrínsecos não forem garantidos como, por exemplo, ter uma atmosfera densa, apresentar movimentos tectônicos, dispor de um campo magnético eficiente no bloqueio da ação de partículas energéticas vindas do espaço, entre outras condições mais sutis. Além disso, essa definição mais comum e fortemente embasada em argumentos antrópicos desconsidera a possibilidade da existência de vida representada pelos micro-organismos "mais simples" e adaptados a ambientes extremos. Um exemplo no Sistema Solar é o planeta Marte, que de acordo com os modelos teóricos está localizado dentro do limite exterior dessa "zona privilegiada", mas não se mostra, pelo menos até o momento, com a capacidade de abrigar vida, mesmo que microbiana. Analisar essa possibilidade mais exótica de manifestação da vida leva a buscar meios alternativos de inspeção in situ, como as missões a planetas e luas do Sistema Solar ou, como no caso de exoplanetas, à investigação de marcadores biológicos que, possivelmente, estejam misturados ao conteúdo gasoso de suas atmosferas, podendo de alguma maneira denunciar a presença de vida.

2.1 Atmosfera como um ambiente habitável

A biosfera terrestre é ativa e interage com a atmosfera formando um verdadeiro ciclo de troca de materiais biológicos e não biológicos. Geralmente, os relatos mostram que os

particulados biológicos presentes na atmosfera estão vinculados a vários fenômenos físico-químicos e até mesmo a comportamentos estratégicos governamentais. Um exemplo dessa relação já havia sido observado em meados do século XIX ao se concluir que a taxa de mortalidade na cidade de Paris estava ligada com a concentração de bactérias encontrada no ar (Miquel, 1883). Recentemente, estudos apontam que partículas biológicas podem influenciar o processo de precipitação em nuvens e agir de forma direta nos ciclos hidrológicos e climáticos em escalas regionais (Rosenfeld et al., 2008; Prenni et al., 2009; Martin et al., 2010). Outros estudos ainda ligados à área médica enfatizam que a presença de partículas biológicas na atmosfera favorece o aparecimento de doenças respiratórias e até mesmo do câncer (Peccia et al., 2011). Toda a dinâmica de atividade desses particulados lançados por diversas fontes à atmosfera vem sendo estudada há tempos e, mesmo sendo uma área de pesquisa multidisciplinar, de difícil aquisição de dados e posterior interpretação, ela se mostra indispensável para o entendimento de parte dos processos físico-químicos que ocorrem na Terra e, certamente, em exoplanetas semelhantes a ela.

Talvez a atmosfera terrestre não seja o habitat mais extremo para a existência de micro-organismos. Ao considerar-se medidas de pH, temperatura, radiação (UV) e disponibilidade de água, esse nicho parece ser bem menos severo quando comparado a outros habitats terrestres. Por exemplo, o pH de nuvens e da água da chuva está na faixa entre 3 e 7 (Warneck, 1988); alguns micróbios se adaptaram a faixas de pH bem mais robustas do que as observadas na atmosfera terrestre, ou seja, existem locais na superfície terrestre onde o pH é extremamente ácido, chegando a valores próximos de zero (Schleper et al., 1995) e em outros onde o pH é muito alcalino alcançando valores perto de 11 (Jones et al., 1998).

Quando se pensa em temperatura, essa pode variar muito ao considerar-se as "faixas" da atmosfera terrestre, porém, tais variações estão dentro de um limite que permite a sobrevivência de micro-organismos. Na baixa atmosfera terrestre, a temperatura média decresce com a altitude, sendo constatados valores de 15 ^{o}C ao nível do mar e -56 ^{o}C a 20 km de altitude (NOAA e Force, 1976). Vários micro-organismos são capazes de sobreviver em temperaturas próximas ou abaixo de 0 ^{o}C e há comunidades metabolicamente ativas em temperaturas menores que -18 ^{o}C (Rothschild e Mancinelli, 2001), mostrando que mesmo com essas variações bruscas para os padrões humanos, a atmosfera pode oferecer condições para a existência desses organismos.

É sabido que o efeito do campo de radiação UV aumenta quando se atinge grandes altitudes. Entretanto, sabe-se também que micro-organismos alocados em altitudes elevadas desenvolveram ao longo do tempo vários mecanismos de reparo aos possíveis danos causados na molécula de DNA, oriundos dos efeitos da exposição à radiação (Witkin, 1976). Há vários exemplos deles, dos quais destacam-se a archaea *Halobacterium salinarum* e a bactéria *Deinococcus radiodurans*. Além dessa constatação, muitos organismos vivos podem atenuar os efeitos da radiação quando estão protegidos dentro de particulados atmosféricos como poeira, pólen ou gotículas de água (Lighthart, 1997). Pigmentos também podem proteger micro-organismos contra a exposição da radiação UV e esse mecanismo é importante, já que garante uma proteção em regiões onde a radiação UVB e UVC não é atenuada pela camada de ozônio (Smith et al., 1992).

A figura 2.1 mostra o resultado de experimentos que detectaram a presença de poeira e micro-organismos em altas altitudes. Por exemplo, *Penicillium notatum* foi coletado a uma altitude de 77 km, assim como as bactérias *Micrococcus albus* e *Micobacterium luteum* a 70 km (Imshenetsky et al., 1978).

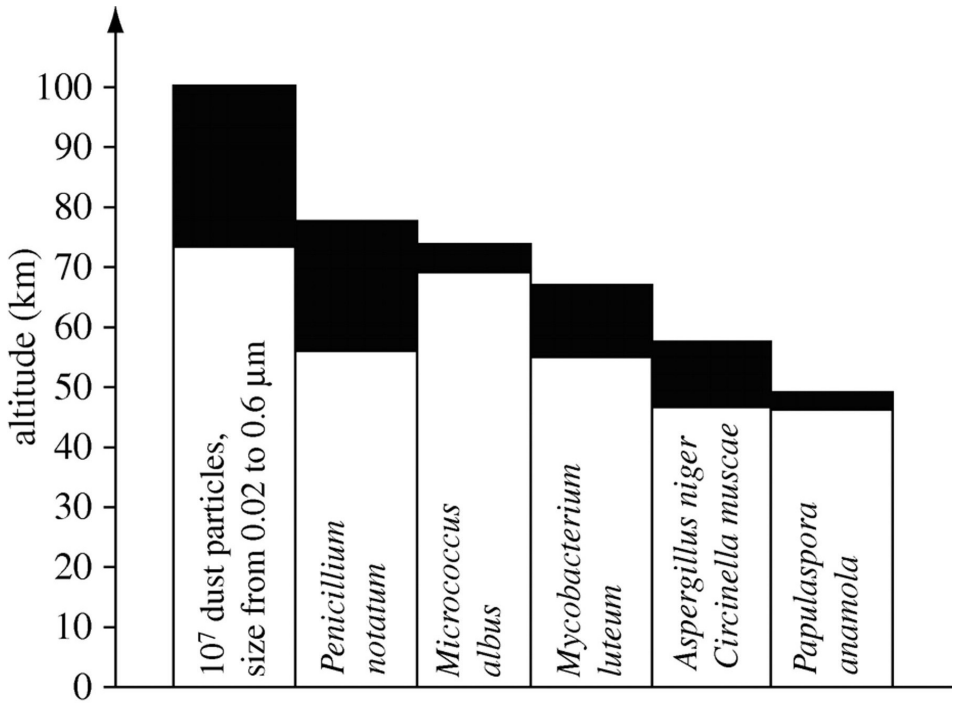

Figura 2.1: Isolamento de micróbios na atmosfera. A porção hachurada corresponde a altitude em que os micro-organismos foram coletados. A primeira coluna indica a altitude onde partículas de poeira foram coletadas. Fonte: (Imshenetsky et al., 1978).

Os resultados encontrados por Imshenetsky et al., 1978 podem ser justificados pela ação da poeira na proteção de micro-organismos contra os efeitos da radiação, assim como pela disponibilidade de nutrientes na atmosfera. De acordo com Pearce et al., 2009, nuvens e gotículas de água da chuva possuem altas concentrações de sulfatos e nitratos; há também no ambiente atmosférico a presença de inúmeras fontes de carbono como ácidos carboxílicos e álcoois que podem facilitar o desenvolvimento de nichos onde micro-organismos conseguem sobreviver.

Apesar das constatações da presença de micro-organismos na atmosfera terrestre e sua interação complexa com a biosfera, ainda há pouca informação coerente sobre sua densidade e sobre sua dependência com o aumento da altitude. Essa falta de conhecimento está relacionada principalmente às dificuldades na construção de aparatos experimentais que garantam a inexistência de contaminação e na falta de padronização na coleta de dados. Tentando preencher essa lacuna Yang et al. (2009), utilizaram dados de alguns experimentos realizados para estudar a densidade de micro-organismos na atmosfera da Terra e estimaram a variação da quantidade de micróbios em relação à altitude. Eles consideraram valores até 35 km e obtiveram uma regressão linear regida pela equação $d = 40/h^2$, onde d representa a densidade de microrganismos (m^{-3}) e h a altitude em quilômetros. Embora fique evidente que a estimativa pode conter erros, principalmente devido à variabilidade atmosférica entre os nichos estudados e os métodos experimentais adotados para coleta, é viável tomar esses valores como uma aproximação, mesmo que pobre, da realidade populacional (micro-organismos) encontrada nesses ambientes. A grande questão que precisa ser respondida nos próximos anos é se há DNA, células ou biomoléculas suficientes nesse envoltório gasoso, passivos de serem detectados remotamente.

2.2 Dispersão de material biológico

O estudo da presença de organismos vivos na atmosfera terrestre é apontado como um fator importante para se compreender a dinâmica do desenvolvimento de nuvens, a química atmosférica e a dispersão de micróbios nas diversas regiões e ecossistemas do planeta. Estima-se uma concentração aproximada de bactérias na faixa de $10^3 - 10^5$ m^{-3} sobre a superfície continental e grande parte de todo esse conteúdo biológico está organizado na forma de aerossóis atmosféricos (Burrows et al., 2009; Harrison et al., 2005; Shaffer e

Lighthart, 1997). Existem vários termos que são utilizados para se referir a particulados presentes na atmosfera terrestre e os mais comuns são: bioaerossóis e o *Primary Biological Aerosol Particles* (PBAP).

O termo aerossol atmosférico pode ser definido como a quantidade de componentes líquidos ou sólidos, englobando todos os tipos de substâncias que estejam presentes na atmosfera. Já o termo PBAP descreve partículas atmosféricas sólidas, vivas ou mortas, que são ou derivam de organismos vivos, incluindo micro-organismos e fragmentos de uma infinidade de seres vivos mais complexos. Os menores PBAP são os vírus e o maiores são partículas constituídas por bactérias, algas, esporos de musgos, samambaias e fungos, pólen, restos de plantas, partes de insetos e células epiteliais humana e animal. A tabela 2.1 mostra as dimensões características de alguns PBAP.

Tabela 2.1 - Dimensão dos principais constituintes dos PBAPs. Fonte: Macher (1993).

Dimensão dos principais PBAP	
Dimensão r (μm)	PBAP
0.005 <r <0.25	vírus;
r $\geq$ 0.2	bactérias;
r $\geq$ 0.5	algas, esporos de musgos, samambaias e fungos;
r $\geq$ 5	pólen;
r $\geq$ 1	partes de insetos e células epiteliais humana e animal.

Segundo Penner et al. (2001), 56 Tg/yr (10^{12} gramas por ano) de PBAP são lançados globalmente à atmosfera, um valor expressivo, porém bem abaixo quando comparado ao lançamento de sal e minerais, que correspondem a 3340 Tg/yr e 2150 Tg/yr. Vários outros pesquisadores também estimaram a quantidade de PBAPs lançados na atmosfera anualmente e seus resultados são divergentes e sugerem quantidades maiores (Matthias-Maser e Jaenicke, 1995). Mesmo com uma quantificação não tão precisa, pode-se afirmar que a atmosfera da Terra é um ambiente repleto de material orgânico oriundo da própria biosfera.

Tem-se ciência de que micro-organismos habitam a superfície de plantas, solos e rochas, e estima-se que esses ambientes naturais possam abrigar concentrações da ordem 10^4 a 10^8 células por cm^2 (Morris et al., 2002; Lindow e Brandl, 2003). Áreas agrícolas ou regiões com intensa atividade humana também possuem uma diversidade muito expressiva de fungos e bactérias, tornando-se fontes consideráveis de material orgânico. Até mesmo os oceanos e a Antártica são fontes de particulados orgânicos. Bactérias já foram encontradas em núcleos

de gelos antárticos em profundidades de 3519 m (Achberger et al., 2011), mostrando que precipitações podem servir como fonte orgânica para esses ambientes criosféricos (Martin et al., 2010) e que talvez ventos possam servir como meio para a ejeção e transporte desses materiais (Pomeroy e Jones, 1996). Os oceanos, por ocuparem praticamente setenta por cento do planeta, são também ambientes propícios a abrigar, receber e ejetar materiais biológicos (archaeas, bactérias, fungos, algas, etc.); a forma de ejeção desses materiais ocorre principalmente por meio de mecanismos do tipo *bubble-bursting* (Blanchard, 1989; O'dowd et al., 2004).

Os PBAPs com maiores taxas de emissão por ano, em direção a atmosfera, são os sais e os minerais, o que faz com que seja interessante utilizar um micro-organismo extremófilo halofílico como modelo neste trabalho. A tabela 2.2 apresenta alguns ecossistemas terrestres e a concentração média total de bactérias observada (m^{-3}) por diversos pesquisadores.

Tabela 2.2 - Estimativa média da quantidade de bactérias presentes próximas à superfície terrestre e em vários ecossistemas terrestres (m^{-3}). Fonte: b - Harrison et al., 2005; c - Lighthart (1997); d - Shaffer e Lighthart (1997); e - Tong (1999) e Tilley et al., 2001; f - Bauer et al., 2002; g - Griffin et al., 2006.

Estimativas da concentração média de bactérias (m^{-3})			
Ecossistema Terrestre	Melhor Estimativa	Pior Estimativa	Estimativa Máxima
Costeiro b	7.6×10^4	2.3×10^4	1.3×10^5
Culturas b	1.1×10^5	4.1×10^4	1.7×10^5
Desertos c	-	1.6×10^2	3.8×10^5
Florestas d	5.6×10^4	3.3×10^4	8.8×10^4
Pastagens b,e	1.1×10^5	2.5×10^4	8.4×10^5
Superfície com Gelo f	-	-	$1,0 \times 10^4$
Mares b,f,g	1.0×10^4	1.0×10^1	8.0×10^4
Arbustos e,f	3.5×10^4	1.2×10^4	8.4×10^5
Tundra d,f	1.2×10^4	-	5.6×10^4
Pantanal	9.0×10^4	2.0×10^4	8.0×10^4
Região Urbana d	6.5×10^5	4.4×10^5	9.2×10^5
Parques Urbanos b	1.2×10^5	4.8×10^4	1.9×10^5

A Antártida pode ser considerada um ambiente ideal para a realização de experimentos relacionados com o transporte aéreo e a sobrevivência de micro-organismos, pois o continente se mantém praticamente "isolado" do resto do mundo pelo oceano Austral e pela corrente circumpolar Antártica. Estudos deste nicho também confirmam a presença de micro-organismos e a tabela 2.3 apresenta a concentração total dessa matéria orgânica.

Tabela 2.3 - Estimativa populacional de micro-organismos adaptados a ambientes que apresentam baixas temperaturas.

Concentração de material orgânico em ambientes Antárticos		
Concentração	Localização	Referência
<1 CFU ml^{-1}	Gelo polar	Abyzov et al., 1982
$1-5$ CFU ml^{-1}	Gelo Glacial	Dancer et al., 1997
$10-50$ células ml^{-1}	Água descongelada	Bulat et al., 2004
$2-3 \times 10^2$ células ml^{-1}	Gelo derretido	Karl et al., 1999
2.8×10^1 e 3.6×10^4 células ml^{-1}	Gelo derretido	Priscu et al., 1999
2×10^4 células ml^{-1}	Deposição eólica (Groelândia)	Tung et al., 2005
6.6×10^4 - 3.7×10^5 células ml^{-1}	Neve derretida, gelos marginais, correntes subglaciais	Skidmore et al., 2005
6×10^7 células ml^{-1}	Núcleo de gelo (Greenland)	Sheridan et al., 2003
10^7 células g^{-1}	Sedimentos sob o gelo da Antártida	Lanoil et al., 2009

Devido às dificuldades de mensuração em escala global e de garantias de não contaminação dos aparatos designados a estimar a quantidade de material biológico na atmosfera, alguns modelos teóricos de circulação atmosférica foram propostos para tal finalidade e a figura 2.2 apresenta o resultado de uma simulação da distribuição de bactérias próximas à superfície terrestre (Burrows et al., 2009).

Por meio da análise dos diversos estudos realizados até o momento, fica evidente que a quantidade de bactérias que pode atingir a alta atmosfera em escala global é expressiva. De maneira geral, constata-se que praticamente todos os ambientes terrestres estão habitados por micro-organismos e que eles talvez possam, se "mergulhados" na atmosfera, fornecer pistas sobre a habitabilidade planetária.

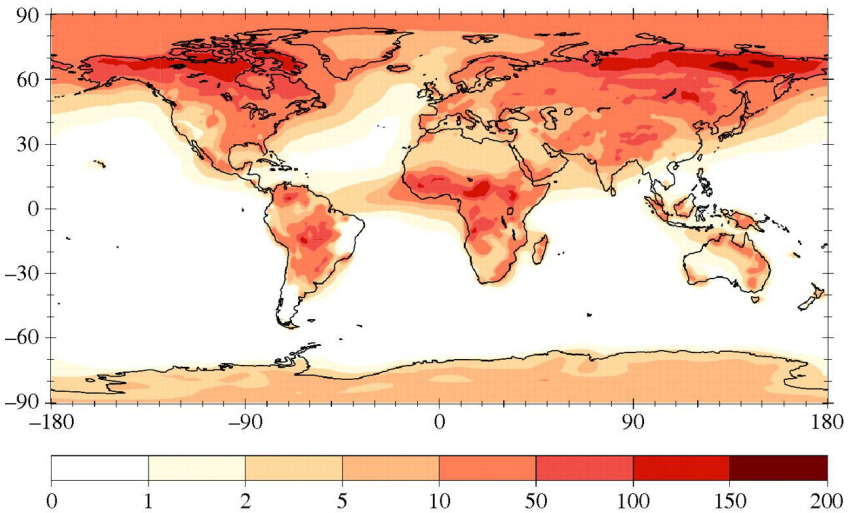

Figura 2.2: Simulação da concentração (10^3 m^{-3}) da distribuição de bactérias (1 μm) no ar próximo a superfície. Fonte: Burrows et al., 2009.

2.3 A Terra vista como um exoplaneta

O conteúdo atmosférico da Terra poderia oferecer evidências suficientes que denunciassem a presença de vida em nosso planeta quando observado remotamente? Essa questão já foi respondida parcialmente por meio da análise de dados da missão *Galileo* (Sagan et al., 1993). Em dezembro de 1990, a sonda *Galileo* fez um *flyby* da Terra em seu caminho para o sistema de Júpiter. Por iniciativa de Carl Sagan, os instrumentos da sonda foram utilizados para observar o planeta Terra de longe. Assim, foi detectado oxigênio em abundância, um pigmento distribuído por todo o planeta, apresentando uma cabeça de banda bem marcada em sua extremidade vermelha (*red edge*, identificada como devida à molécula da clorofila) e gás metano em forte desequilíbrio termodinâmico (uma das características conhecidas da presença de vida em um planeta). Foram também detectadas emissões em rádio com intensidade variável e frequência modulada só podendo, muito provavelmente, serem produzidas por seres inteligentes (Sagan et al., 1993).

O que a sonda *Galileo* detectou, na verdade, foi o que se chama hoje de "critérios Sagan de vida", ou seja, uma forte banda de absorção na parte vermelha do espectro visível (sobretudo sobre os continentes), causada pela clorofila das plantas (que a utilizam para realizar fotossíntese), bandas de absorção de oxigênio molecular, que são também resultados da fotossíntese, bandas de absorção no infravermelho devido ao metano presente na atmosfera (um gás que precisa ser reposto, seja por atividade vulcânica, seja por atividade biológica) e transmissões moduladas de rádio em banda estreita, que não são produzidas por nenhuma fonte natural conhecida. A *Galileo* estabeleceu então os primeiros critérios de controle do novo ramo de ciência da época, a Astrobiologia. A figura 2.3 apresenta os espectros detectados pela sonda *Galileo*, os quais constituem os primeiros critérios de busca de vida em outros mundos, sendo apenas indicadores dessa possibilidade.

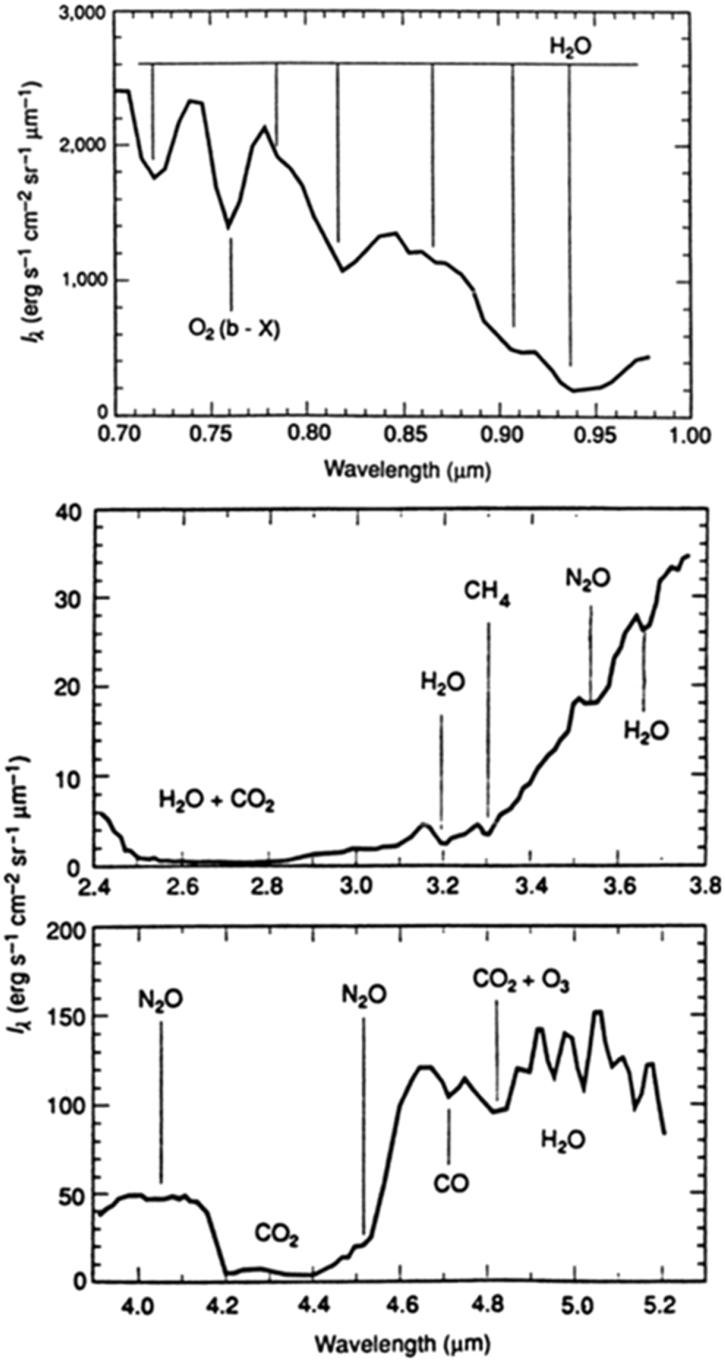

Figura 2.3: Espectro visível e no infravermelho próximo detectado pela sonda *Galileo* em 1990. Neles, pode-se observar algumas bandas de CO_2, vapor de água, N_2O, O_3 e CH_4. Fonte: Sagan et al., 1993.

Outra medida realizada com a finalidade de detectar bioassinaturas provenientes da Terra foi por meio do projeto *Earthshine*. A ideia consiste em observar o planeta Terra como se o observador estivesse fora dele usando, em particular, a luz do Sol refletida pela Terra na Lua (Briot et al., 2009). Observações do *Earthshine*, realizadas nos observatórios

Haute Provence e no ESO, confirmaram a existência do *red edge* atribuído à clorofila, mostrando que detecções remotas são possíveis e dependentes apenas da sensibilidade e resolução espectral. É possível que se um planeta é habitável, então, ele certamente pode ter sua atmosfera contaminada por biomoléculas complexas e até mesmo por micro-organismos que, provavelmente, podem ser passíveis de serem detectados remotamente.

A figura 2.4 mostra alguns aspéctos da idealização deste projeto, ou seja, espera-se detectar na atmosfera terrestre algum sinal proveniente de uma estrutura biológica complexa (DNA, células suspensas, etc.), já que há mecanismos capazes garantir a presença desses materiais em altitudes elevadas.

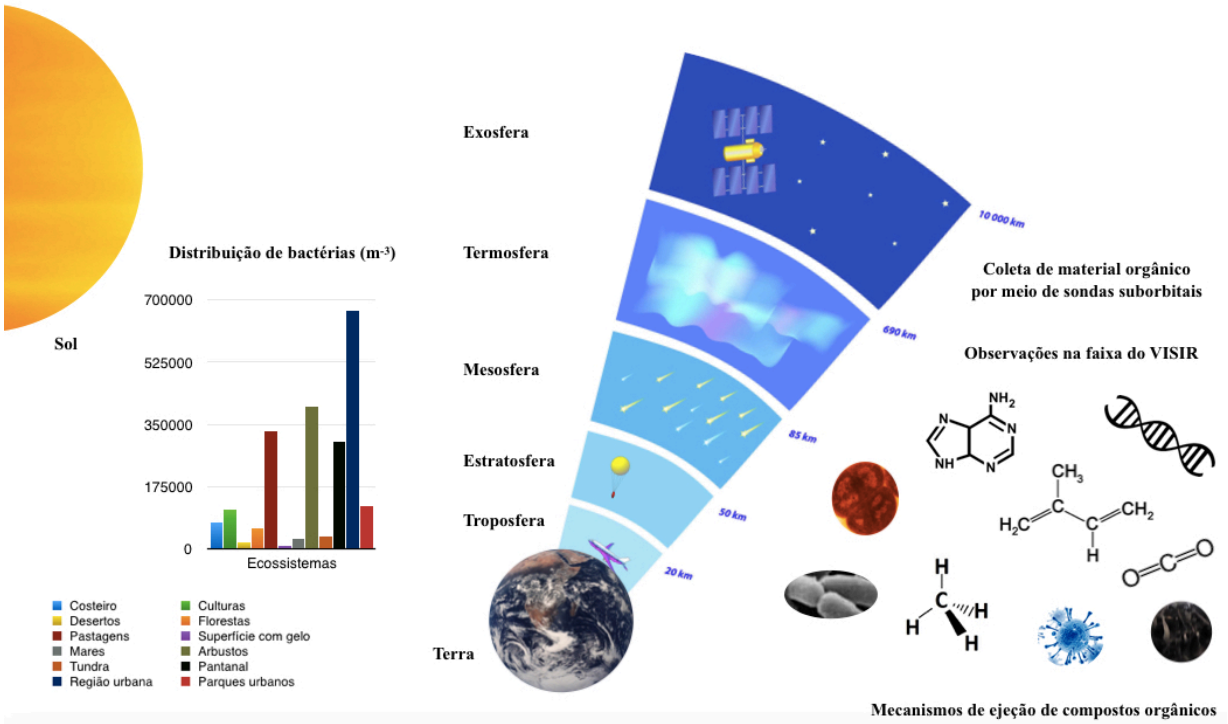

Figura 2.4: Provável cenário de ejeção e busca de sinais biológicos na atmosfera terrestre. Fonte: baseado em Burrows et al., 2009.

Capítulo 3

Espectroscopia vibracional

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica analítica amplamente utilizada em vários ramos de pesquisa, dentre os quais se destacam a bioquímica, a biologia, a ciência de materiais e a biomedicina. Desde a confirmação da existência da radiação infravermelha pelo Sir Willian Hershel, em 1800, o estudo da interação dessa radiação com os mais diversos tipos de materiais, incluindo os biológicos, vem evoluindo; essa evolução permitiu já nos anos cinquenta do século passado o estudo da estrutura conformacional de polipepitídeos e proteínas. Alguns anos mais tarde, os constantes aprimoramentos tecnológicos e o uso de técnicas mais apuradas permitiram uma melhor compreensão da dinâmica conformacional das proteínas, assim como a análise de ácidos nucléicos, lipídeos e carboidratos (Mantsch et al., 1996). Atualmente, a técnica é também empregada na caracterização de doenças, na identificação de micro-organismos, no estudo de polímeros, na análise de poluentes atmosféricos, no estudo de semicondutores, no controle de qualidade de produtos e em investigações forenses (de Almeida Barbosa, 2007).

3.1 Espectroscopia de biomoléculas

A maior parte do conteúdo desta pesquisa tem como base a caracterização de moléculas complexas como o DNA, assim como células suspensas de micro-organismos (archaeas e bactérias em solução, depositadas diretamentes sobre janelas espectroscópicas). O espectro infravermelho de uma amostra biológica é obtido quando essa é exposta à presença de um feixe de luz, que possui energia correlacionada a uma região específica do espectro eletromagnético que, neste caso, estará compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1}, já que os principais modos vibracionais desses materiais orgânicos são observados nessa faixa específica do es-

pectro, denominada infravermelho médio (vide figuras 3.1 e 3.2). A análise desses modos de vibração pode prover informações relevantes que servirão como referência na busca de vida fora da Terra.

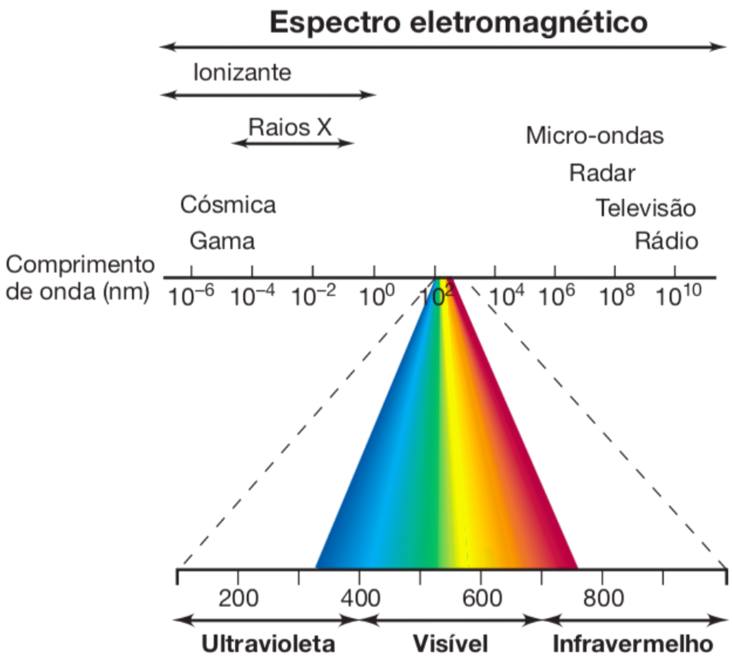

Figura 3.1: Espectro eletromagnético. Fonte: Madigan et al., 2003.

A referência à radiação infravermelha estará vinculada a uma unidade denominada número de onda $\widetilde{\nu}$ em detrimento da unidade usualmente empregada na astronomia, o comprimento de onda λ. A razão para tal escolha se apega ao fato de que essa unidade é muito encontrada na literatura específica, o que facilita estudos comparados, além do que ela é diretamente proporcional à energia, ou seja,

$$E = hc\widetilde{\nu}. \tag{3.1}$$

Na equação anterior h é a constante de Planck, c a velocidade da luz e $\widetilde{\nu}$ é o número de onda.

A natureza da radiação eletromagnética pode ser abordada por duas teorias distintas: a teoria eletromagnética clássica, desenvolvida por Maxwell, e a teoria quântica, oriunda dos trabalhos de Einstein, Planck e Bohr. As moléculas, quando absorvem radiação, são excitadas e atingem níveis de energia mais elevados (vide figura 3.2), constituindo, assim, um processo quantizado; essa quantização já aparece implícita na equação (3.1). Na

maioria das moléculas, essas energias estão correlacionadas a frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações, onde observam-se mudanças nas distâncias interatômicas e alterações angulares entre as ligações (vide figura 3.2). Desse modo, no processo de absorção, a energia entregue pela fonte radiativa corresponde à mesma frequência de vibração natural da ligação da molécula, o que possibilita um aumento na amplitude dos movimentos vibracionais em arranjos geométricos capazes de gerar momento de dipolo elétrico, pois esse dipolo irá se acoplar com a onda eletromagnética incidente.

É possível explicar matematicamente a origem das absorções moleculares quando se imagina um sistema simples, constituído por dois átomos distintos, conectados por uma mola, o que dá origem a um sistema mecânico conhecido como oscilador harmônico simples, que pode ser descrito pela equação diferencial (3.2):

$$m\left(\frac{d^2x}{dt^2}\right) = -kx. \tag{3.2}$$

A resolução da equação (3.2) leva a

$$m\left(\frac{d^2x}{dt^2}\right) = -4\pi^2\nu_{osc}^2 x_0 sen\left(2\pi\nu_{osc}t + \phi\right). \tag{3.3}$$

Assim, x representa uma distância relacionada a um deslocamento qualquer, t o tempo, x_o a máxima amplitude do movimento, ϕ a fase do movimento e ν_{osc} a frequência vibracional do oscilador. A figura 3.2 mostra um esquema representando a curva de energia potencial para osciladores harmônicos e anarmônicos, além de alguns modos de vibração molecular.

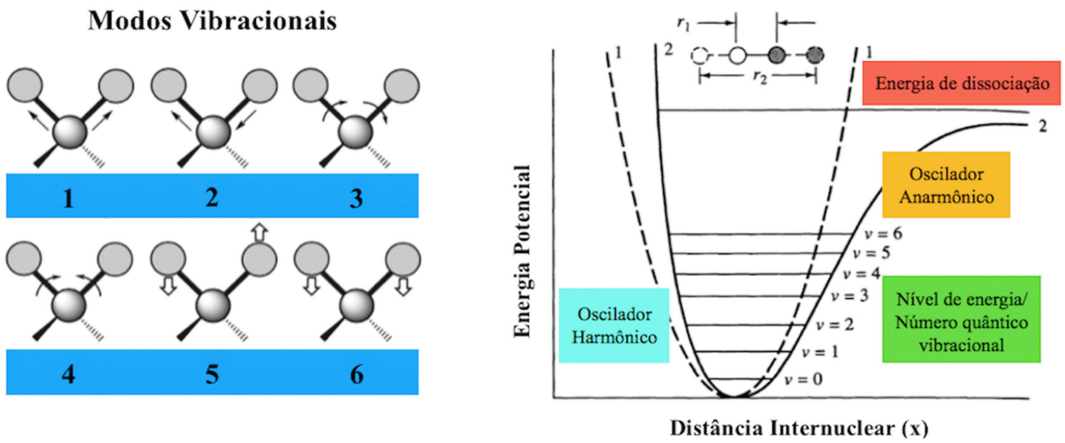

Figura 3.2: Modos de vibração e representação da energia oriundas da absorção da radiação infravermelha.

Quando uma molécula recebe energia do meio, ela passa do estado de vibração fundamental (menor energia) para um estado de energia superior, o que gera as denominadas bandas de absorção. Se a transição ocorre do nível zero para o nível 1, o processo físico dará origem a uma vibração denominada fundamental; se a energia é suficiente para gerar transições superiores, então, as vibrações são chamadas de harmônicas. Vale lembrar que, além dessas, existem ainda as vibrações oriundas de acoplamentos como, por exemplo, a ressonância de Fermi (fenômeno quântico responsável por deslocamentos de energias e intensidades de bandas de absorção, vinculados aos espectros de infravermelho ou Raman), o que pode tornar a análise de espectros de materiais biológicos uma tarefa árdua e dependente de métodos matemáticos (deconvolução, testes de primeira e segunda derivada, etc). De uma maneira geral, a energia total envolvida no fenômeno de absorção é proporcional à frequência de vibração do oscilador ($E_{osc} \sim h\nu_{osc}$). Vale lembrar que, em um caso mais simples, a frequência de um oscilador é determinada pela constante de força k da mola e pelas massas dos dois átomos:

$$\nu_{osc} = \frac{1}{2\pi}\sqrt[2]{\frac{k}{\mu}}. \tag{3.4}$$

Considerando que a massa reduzida do sistema, μ, é igual a

$$\mu = \frac{m_1 \times m_2}{m_1 + m_2}. \tag{3.5}$$

A equação (3.4) ainda pode ser escrita em função do número de onda, admitindo a velocidade da luz na unidade cm/s:

$$\widetilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c}\sqrt[2]{k\frac{m_1 + m_2}{m_1 \times m_2}}. \tag{3.6}$$

É importante ressaltar que, o valor da constante k varia de acordo com o tipo de ligação, assim como com os fenômenos de ressonância e de hibridização. Por exemplo, ligações mais fortes possuem valores para a constante k maiores e vibram em frequências maiores se comparadas a ligações fracas envolvendo as mesmas massas; as ressonâncias, ao contrário, reduzem o valor da constante k. Assume-se para fins teóricos que a constante k apresenta valores aproximados iguais a 5 $\times 10^2$ N/m para ligações simples, 1 $\times 10^3$ N/m para ligações duplas e 1.5 $\times 10^3$ N/m para ligações triplas (Skoog e Leary, 1992).

Após ser exposta à radiação infravermelha, o conteúdo biológico constituído de N moléculas por centímetro cúbico de amostra apresentará um espectro composto por bandas de absorção, proporcionais ao quadrado da variação do momento de dipolo (de Almeida Barbosa, 2007). Essa absorção pode ser aproximada pela equação

$$\int a_\nu d\widetilde{\nu} = \frac{N\pi}{3c^2}\left[\frac{\partial\zeta}{\partial q}\right]^2 . \tag{3.7}$$

Assim, a_ν é o coeficiente de absorção, ζ o momento de dipolo e q a coordenada normal de vibração.

De maneira geral, a análise do espectro infravermelho demonstra que as vibrações de estiramento fornecem bandas mais intensas quando comparadas com aquelas oriundas de deformações angulares. Essa informação é importante, pois os espectros de moléculas de DNA, assim como os de células suspensas de micro-organismos apresentarão intensas bandas de absorção devido à presença de alguns grupos funcionais como a carbonila, a hidroxila, o amino, etc. A figura 3.3 apresenta de forma simplificada a localização de algumas ligações e grupos funcionais que são importantes na análise desses espectros.

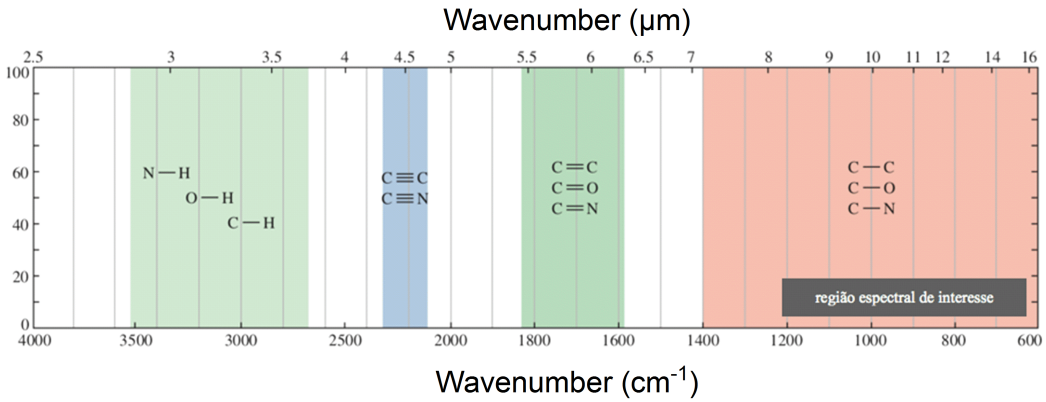

Figura 3.3: Localização espectral de grupos funcionais na faixa do infravermelho médio. Fonte: adaptado de Wade, 2012.

3.2 Aparato experimental e o objetivo das medidas

Nos laboratórios, o instrumento responsável pela aquisição dos espectros de absorção é chamado de espectrômetro de infravermelho ou espectrofotômetro. O laboratório da UNIVAP dispõe de espectrofotômetros com transformada de Fourier (FTIR) aptos a realizarem medidas na faixa de 400 a 4000 cm^{-1}, podendo operar no modo de transmissão ou

no modo ATR (feixe atenuado). Esse tipo de equipamento é responsável pela produção de um padrão conhecido como interferograma, que é essencialmente um espectro no domínio temporal (gráfico de intensidade versus tempo). Por meio de uma operação matemática, conhecida como transformada de Fourier, é possível realizar a análise desse mesmo espectro no domínio da frequência (gráfico de intensidade versus frequência). A tabela 3.1 resume as informações básicas dos equipamentos utilizados para a obtenção dos espectros.

Tabela 3.1 - Características do equipamento utilizado na aquisição dos dados.

Aquisição dos espectros infravermelho	
Espectrofotômetro	Spectrum Spotlight 400 FT-IR (PerkinElmer)
Resolução	4 cm^{-1}
Modo	Transmissão / ATR
Número de varreduras	32
Intervalo	1 cm^{-1}
Temperatura de operação	∼20 °C
Análise de dados	
Softwares	Spectrum 5.3; ORIGIN 9.0; MINITAB 17

A espectroscopia por transmissão (FTIR e micro-FTIR) é baseada na absorção da radiação infravermelha quando esse campo passa através de uma certa quantidade de amostra. O equipamento disponível no laboratório da UNIVAP ainda permite o acoplamento de um microscópio e a utilização da técnica de microespectroscopia, responsável por analisar amostras em escalas microscópicas a partir de pequenas quantidades. Esta disposição foi importante para o desenvolvimento do trabalho porque permitiu a aquisição de espectros de transmissão, utilizando-se filmes finos obtidos por meio de volumes da ordem 30 μl de células suspensas de micro-organismos e de DNA. Há várias janelas utilizadas para a deposição de material biológico como, por exemplo, o fluoreto de cálcio, o fluoreto de bário, entre outras. Porém, optou-se pela utilização de uma janela de seleneto de zinco, de aproximadamente 13 mm por 3 mm, que é transparente ao infravermelho e permite que se trabalhe com uma quantidade de amostra bem pequena quando comparada a técnicas que se utilizam de cubetas.

Outro método utilizado na caracterização das amostras biológicas foi a espectroscopia por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR). O FTIR-ATR se vale de um fenômeno conhecido como reflexão interna total. Nele, um campo de radiação interage com um cristal e sofre várias reflexões a partir do instante em que o ângulo de incidência entre a amostra e o cristal é maior que o ângulo crítico. Esse, por sua vez, é uma função do índice

de refração das duas superfícies e pode ser estimado pela equação 3.8

$$\theta_c = sen^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right). \tag{3.8}$$

Considera-se que n_1 e n_2 são os índices de refração do meio, sendo o segundo o mais denso. O campo de radiação penetra numa fração da amostra e esta absorve sua energia. A resultante das várias atenuações do campo de radiação é medida e plotada como função do número de onda pelo espectrofotômetro, dando origem a um espectro de absorção que contém as características da amostra. Vale ressaltar que, a profundidade da penetração é uma função do número de onda, do índice de refração do cristal e do ângulo de incidência da radiação. A profundidade de penetração é mensurada por

$$D_p = \frac{\lambda_1}{2\pi n_1\sqrt{(sen^2(\theta) - n_{21}^2)}}. \tag{3.9}$$

Essa dependência com o número de onda pode gerar diferenças nos espectros obtidos por essa técnica quando comparados aos espectros adquiridos pelo método FTIR por transmissão, porém softwares matemáticos que compõe o equipamento contornam satisfatoriamente o problema. A figura 3.4 mostra o aparato experimental utilizado para a aquisição dos dados.

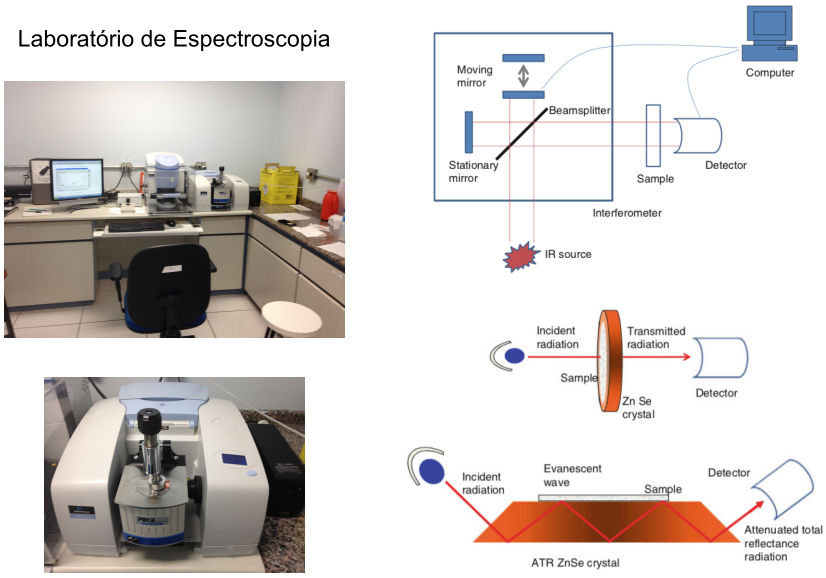

Figura 3.4: Laboratório de espectroscopia e representação do aparato e das técnicas experimentais utilizadas nas medidas. Fonte: baseado em Alvarez-Ordóñez e Prieto, 2012.

A proposta e a elaboração de protocolos feitos e desenvolvidos em laboratório visavam, mesmo que de maneira simplificada, simular a interação da radiação infravermelha com um meio opticamente ativo, isto é, com o provável conteúdo biológico existente na atmosfera terrestre e que, por hipótese, possa ser encontrado em exoatmosferas de planetas semelhantes ao planeta Terra. Do ponto de vista teórico, utilizou-se a teoria eletromagnética clássica, onde a radiação eletromagnética é considerada como o acoplamento de dois campos oscilantes, um elétrico e outro magnético, perpendiculares entre si, em fase, propagando-se no vácuo com velocidade constante. A velocidade referida é a velocidade da luz, cujo valor é de aproximadamente $2,997925 \times 10^8\ m/s$. A intensidade da radiação eletromagnética que vai interagir com a amostra é proporcional à média temporal do quadrado do campo elétrico e é dada em unidades de W/m^2. No vácuo, essa intensidade é expressa como

$$I = \varepsilon_0 c_0 \left\langle \overrightarrow{E}^2 \right\rangle_t . \tag{3.10}$$

Os símbolos ε_0 e c_0 denotam, respectivamente, a constante elétrica e a velocidade da luz no vácuo. Entretanto, o campo elétrico que aparece na equação 3.10 ainda pode ser escrito como

$$\overrightarrow{E} = \overrightarrow{A} e^{2\pi i \left(\frac{x}{\lambda} - \nu t\right)}. \tag{3.11}$$

Considera-se que o vetor $\overrightarrow{A}$ representa a amplitude, ν a frequência, t o tempo e λ o comprimento da onda, respectivamente. Como as medidas não foram realizadas no vácuo, há necessidade da introdução de uma outra variável, o índice de refração complexo, que é definido como

$$\widehat{n} = n + ik. \tag{3.12}$$

Desse modo, $\widehat{n}$ é o índice de refração real e k índice de absorção ou índice de refração imaginário. O índice k é uma constante que expressa a absorção da luz pelo meio. Existe ainda uma relação a se considerar entre o comprimento de onda no meio e o comprimento de onda no vácuo expressa por

$$\lambda = \frac{\lambda_0}{\widehat{n}}. \tag{3.13}$$

Uma simples substituição do fator λ_0 por λ leva à seguinte equação

$$E = Ae^{\left(-\frac{2\pi kx}{\lambda_0}\right)}e^{2\pi i\left(\frac{nx}{\lambda_0}-\nu t\right)}. \tag{3.14}$$

É fácil observar que amplitude da onda decresce com o fator $-\frac{2\pi kx}{\lambda_0}$ e é diretamente proporcional a um caminho a ser percorrido e também à interação com o material que preenche o meio. Logo, considerando que a intensidade da onda eletromagnética é proporcional ao quadrado da amplitude do campo elétrico e que as amostras estavam acomodadas em uma estrutura ou filme de espessura l, pode-se afirmar que a radiação eletromagnética apresentará um valor inicial I_0 ao penetrar esse espaço e um valor I quando percorrer toda a estrutura interagindo com as moléculas da amostra. Matematicamente, essa ideia pode ser escrita como

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\left[\left|\overrightarrow{A}\right| e^{\left(\frac{-2\pi kl}{\lambda_0}\right)}\right]^2}{\left|\overrightarrow{A}\right|^2}. \tag{3.15}$$

O resultado é a Lei de Lambert-Beer

$$I = I_0 e^{-\alpha l}. \tag{3.16}$$

Aqui, o fator α representa a magnitude da absorção.

O interessante desse estudo é a possibilidade de comparação entre os espectros adquiridos em laboratório com os espectros da atmosfera terrestre, oriundos dos dados do ESO. Outro aspecto de grande importância, é a determinação de uma banda marcadora, que possa servir como fonte para uma calibração, objetivando a determinação de uma quantidade mínima de material biológico passível de ser detectada remotamente.

3.3 Modos vibracionais de moléculas de interesse astrobiológico

Como já mencionado, a espectroscopia no infravermelho é uma poderosa ferramenta quando utilizada na análise de materiais biológicos e seus espectros refletem a estrutura química e a orientação tridimensional das moléculas contidas em uma amostra. As bandas de absorção na região do infravermelho médio, oriundas principalmente de modos de vibração, podem ser correlacionadas a grupos funcionais particulares (Naumann, 2000). A seguir, discute-se algumas janelas ou sub-regiões espectrais que apresentam características

específicas e podem facilitar a análise de materiais biológicos utilizados neste trabalho (vale ressaltar que esses valores são aproximados).

A região entre 4000 e 3100 cm^{-1} é fortemente dominada pelos modos de vibração dos agrupamentos OH e N-H. Aqui, ainda pode-se identificar bandas de absorção devido às presenças da Amida A em 3300 cm^{-1}, da Amida B em 3030 cm^{-1} e do estiramento do grupo OH em 3400 cm^{-1}.

A janela compreendida entre 3100 e 2800 cm^{-1} reflete o domínio de vibrações de estiramento do tipo C-H, presentes nos grupos funcionais CH_3 e CH_2, que são característicos das cadeias de ácidos graxos (lipídeos) e de alguns aminoácidos.

A região entre 1800 e 1500 cm^{-1} apresenta picos intensos devido à presença de grupos funcionais como a Amida I e Amida II, pertencentes à estrutura de proteínas e peptídeos; é uma faixa espectral onde encontram-se informações sobre a estrutura proteica. As bandas próximas 1740 cm^{-1} têm origem em vibrações de estiramento do tipo C=O de grupos funcionais como os ésteres pertencentes aos lipídeos. Nessa região, existem ainda absorções devido aos ácidos nucléicos, oriundas de estiramentos do tipo C=O, C=N e C=C, presentes nas estruturas de bases heterocíclicas de moléculas como o DNA e o RNA.

A janela entre 1500 e 1200 cm^{-1} é uma região mista, influenciada pelos modos de dobramento ou flexão (*bending modes*) de grupos CH_2 e CH_3 presentes em proteínas, ácidos graxos e compostos contendo fosfato.

A faixa espectral entre 1200 e 900 cm^{-1} apresenta vibrações de estiramento simétrico devido a grupos PO^-, oriundos de ácidos nucléicos. Observa-se também, nessa região, vibrações com origem em estiramentos do tipo C-O-C e C-O-P, provenientes da presença de carboidratos e polissacarídeos, que constituem a parede celular e denunciam a influência dos ácidos nucléicos.

A janela entre 900 e 600 cm^{-1}, denominada *true fingerprint region*, é caracterizada por apresentar bandas de absorção muito fracas e específicas. A origem dessas absorções está ligada aos nucleotídeos e a vibrações de anéis presentes nas estruturas de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano, fenilalanina).

A análise de materiais biológicos tais como células suspensas e especialmente a molécula de DNA é difícil, já que a precisão na localização dos picos de absorção é muito sensível às condições do meio como, por exemplo, a temperatura, o nível de pH e a umidade. Na análise do DNA ainda deve-se considerar a mudança na posição de alguns marcadores

devido a diferentes possibilidades de conformações que a molécula pode apresentar (A, B e Z *backbone conformers*). A tabela 3.2 apresenta valores aproximados de algumas bandas de absorção que servirão de guia para a interpretação do espectro de sistemas biológicos.

Tabela 3.2 - Principais valores de absorção para materiais biológicos. Fonte: Stuart, 2006.

Principais bandas no infravermelho	
Número de onda (cm^{-1})	Possível atribuição
3010	Estiramento C-H
2956	Estiramento assimétrico CH_3
2920	Estiramento assimétrico CH_2
2870	Estiramento simétrico CH_3
2850	Estiramento simétrico CH_2
1730	Estiramento C=O
1485	Dobramento assimétrico $(CH_3)_3N^+$
1473, 1472, 1468, 1463	CH_2 "scissoring"
1460	Dobramento assimétrico CH_3
1405	Dobramento simétrico $(CH_3)_3N^+$
1378	Dobramento simétrico CH_3
1400 - 1200	CH_2 "wagging band progression"
1228	Estiramento assimétrico PO_2^-
1170	Estiramento assimétrico CO-O-C
1085	Estiramento simétrico PO_2^-
1070	Estiramento simétrico CO-O-C
1047	Estiramento C-O-P
972	Estiramento assimétrico $(CH_3)_3N^+$
820	Estiramento assimétrico P-O
730, 720, 718	CH_2 "rocking"

Os ácidos nucléicos são polímeros de nucleotídeos, ou seja, são moléculas formadas por unidades menores, constituídas por um açúcar, uma base nitrogenada e um grupo fosfato. Eles são encontrados nas células sob duas formas: o RNA e o DNA. A caracterização espectroscópica do DNA pode ser mais facilmente compreendida dividindo o espectro de acordo com as características de absorção de alguns grupos funcionais presentes na molécula (bases, açúcares e fosfatos). Por exemplo, bandas de absorção na região entre 1800 e 1500 cm^{-1} têm suas origens ligadas a vibrações purínicas e pirimidínicas, que são atribuídas a bases como a guanina, a uracila, a timina, a adenina e a citosina. Muitos autores examinam essa região utilizando soluções de D_2O como solvente; o objetivo do procedimento é eliminar a interferência da água. Entretanto, neste trabalho, o material biológico foi mergulhado em soluções aquosas, pois se houver algo orgânico disperso na atmosfera ele estará em contato com esse solvente. Bandas de absorção presentes na faixa compreendida entre 1500 e 1250 cm^{-1} surgem devido às vibrações do emparelhamento de bases e açúcares, enquanto as bandas observadas na janela entre 1250 e 1000 cm^{-1} aparecem devido a vibrações dos

grupos açúcar-fosfatos. Já a região entre 1000 e 700 cm^{-1} é caracterizada por bandas de absorção com a origem ligada a vibrações de açúcares/açúcar-fosfato (Heidari, 2016). A figura 3.5 mostra, em detalhe, parte do espectro da molécula de DNA, assim como algumas regiões e bandas importantes para a caracterização da molécula.

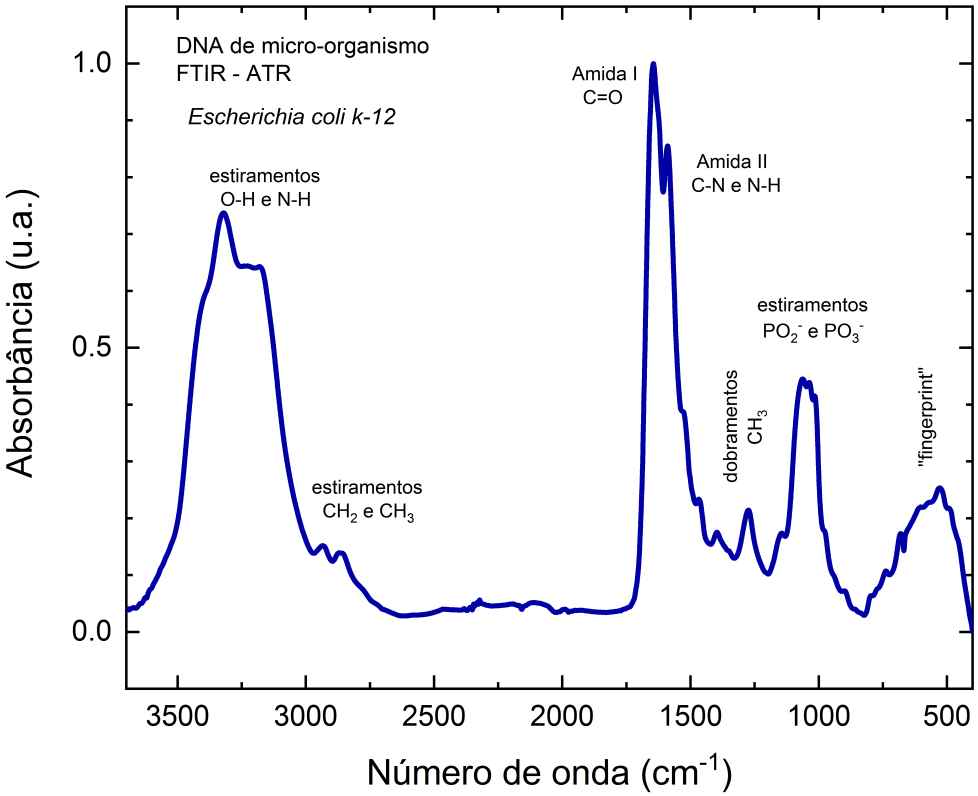

Figura 3.5: Espectro no infravermelho da molécula de DNA de um micro-organismo, mostrando algumas bandas características como as da Amida I e Amida II. O DNA desse micro-organismo faz parte de uma biblioteca oriunda deste projeto.

O estudo de micro-organismos por meio de técnicas de espectroscopia no infravermelho é complexo. Geralmente, tais espectros podem apresentar a superposição de centenas de modos de vibrações (Stuart, 2004). Naumann (2000) demonstrou que o espectro FTIR de bactérias apresenta bandas predominantemente devido aos seus componentes protéicos, isso porque embora as células contenham RNA, DNA, carboidratos, lipídios, entre outros componentes, em termos de massa, o conteúdo protéico predomina. Sendo assim, uma estratégia simplificada para a identificação de micro-organismos é a busca por similaridades com os modos de vibração de proteínas. A figura 3.6 mostra o espectro típico de células em suspensão de um micro-organismo exposto à radiação infravermelha.

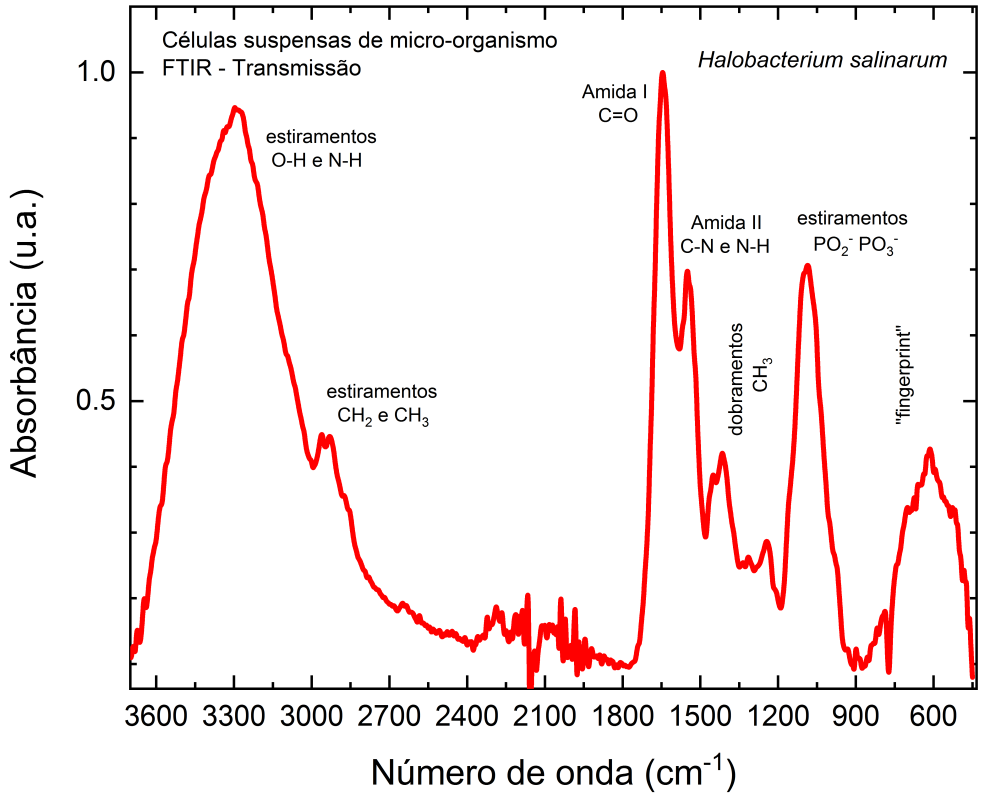

Figura 3.6: Espectro no infravermelho de células suspensas de um micro-organismo extremófilo, mostrando algumas bandas características como as da Amida I e Amida II. O espectro desse micro-organismo faz parte de uma biblioteca oriunda deste projeto.

O apêndice A contêm tópicos com alguns dados de absorção existentes na literatura de moléculas como os lipídeos e as proteínas, que são importantes na caracterização dos espectros adquiridos experimentalmente.

3.4 Técnicas matemáticas e tratamento de dados

Quando se deseja reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados espectroscópicos sem alterações das relações químicas das amostras, a técnica denominada Análise de Componentes Principais pode ser utilizada. É estabelecido, então, um novo conjunto de variáveis ortogonais entre si, chamado de componentes principais, que possui o papel de representar as maiores variabilidades entre as amostras. Essas variáveis são obtidas através de transformações lineares de uma matriz X, contendo os dados originais do espectro, ou seja,

$$X = TP^T + E. \tag{3.17}$$

Na equação anterior, considera-se que T é a matriz de *scores*, formada pelas coordenadas dos espectros na nova variável; P é a matriz de pesos (*loadings*), representada pelos coeficientes das combinações lineares das variáveis originais e E é a matriz de resíduos. Essa técnica matemática permite avaliar de forma eficiente as similaridades entre as amostras espectrais, agrupando aquelas que possuem grandes correlações estruturais e as discriminando das que possuem características diversas. Além disso, é possível identificar quais parâmetros (variáveis) são mais relevantes ao resultado que se pretende alcançar.

Outro procedimento bastante utilizado no tratamento de dados é a análise por *Cluster*, pois facilita a interpretação do significado do conteúdo de amostras que possuem um grande número de variáveis, correlacionadas ou não entre si. Quando se considera os espectros de materiais biológicos, a técnica apresentará as proximidades (ou afinidades) entre as amostras em um esquema bidimensional. Esse esquema, denominado dendograma, é construído determinando-se as distâncias entre essas amostras no espaço multidimensional. Há várias maneiras de se calcular a distância entre dois pontos A e B (d_{AB}). A mais utilizadas pelos espectroscopistas é a distância Euclideana, definida por

$$d_{AB} = \sqrt{\sum (x_{ai} - x_{bi})^2}. \tag{3.18}$$

Aqui, x_{ai} e x_{bi} são as 'i-ésimas' variáveis das amostras A e B, respectivamente, contidas no espaço multidimensional. A partir de um dendrograma, pode-se inferir também sobre amostras anômalas (*outliers*), sendo essas as que possuem as maiores distâncias no espaço amostral.

Outros tratamentos matemáticos utilizados para a construção do banco espectral foram o teste de primeira e segunda derivadas, assim como a deconvolução de bandas. Os testes de derivadas são utilizados para diversos fins, porém, neste estudo, essa ferramenta serviu para confirmar e apontar picos de absorção. O algoritmo mais utilizado para esse objetivo é *Savitzky-Golay*, que fornece uma maneira razoável de contornar o problema da resolução digital finita do FTIR. Assim, ao se analisar os espectros por meio da derivada de segunda ordem, deve-se associar cada ponto de mínimo do gráfico a um pico de absorbância do espectro.

Geralmente, os espectros de materiais biológicos apresentam bandas complexas e superpostas. Algumas dessas bandas carregam informações importantes como, por exemplo, a conformação da estrutura do DNA (Amida I). Para analisar tais bandas (*overlapping*),

usa-se o processo de deconvolução do espectro.

Capítulo 4

Micro-organismos extremófilos

Por muito tempo acreditou-se que existiam na Terra ambientes inabitáveis: as denominadas zonas mortas. Essa crença era aceita porque estes nichos apresentavam parâmetros físico-químicos muito distintos daqueles suportados pela visão antrópica a respeito das condições ideais para a existência da vida. Contudo, a descoberta de micro-organismos capazes de viver em condições extremas abriu uma nova janela na tentativa de compreender como a vida se originou, evoluiu e possivelmente se espalhou pelo Universo.

4.1 Terra primitiva

O Sistema Solar formou-se a partir da contração gravitacional de um fragmento de nuvem molecular, constituída provavelmente por poeira, gás e alguns poucos elementos pesados, por meio de um processo complexo observado atualmente em outras regiões da Via Láctea. Neste contexto, a análise e a compreensão das condições terrestres ao longo de sua evolução se tornam parâmetros importantes para se entender como possivelmente a vida se originou e evoluiu.

Segundo Kenyon e Hartmann (1987), planetas rochosos ou internos devem ter uma origem inicialmente aquecida e com o passar do tempo experimentam um processo contínuo de resfriamento. Esse cenário, aponta para um início onde a existência de água no estado livre seria praticamente impossível, já que se estima que a temperatura superficial do planeta atingiu valores da ordem de 2000 K (Allègre et al., 1995). Logo após a formação completa da Terra, as condições para o aparecimento da vida não eram ideais, pois o planeta passava por períodos de atividades vulcânicas intensas e era constantemente bombardeado por corpos externos, o que tornava o ambiente muito hostil. Estima-se que o fim do

período de bombardeamento pesado ocorreu por volta de aproximadamente 3.8 bilhões de anos (Zahnle et al., 1988). A figura 4.1 aponta os eventos de bombardeamento ocorridos no passado do planeta.

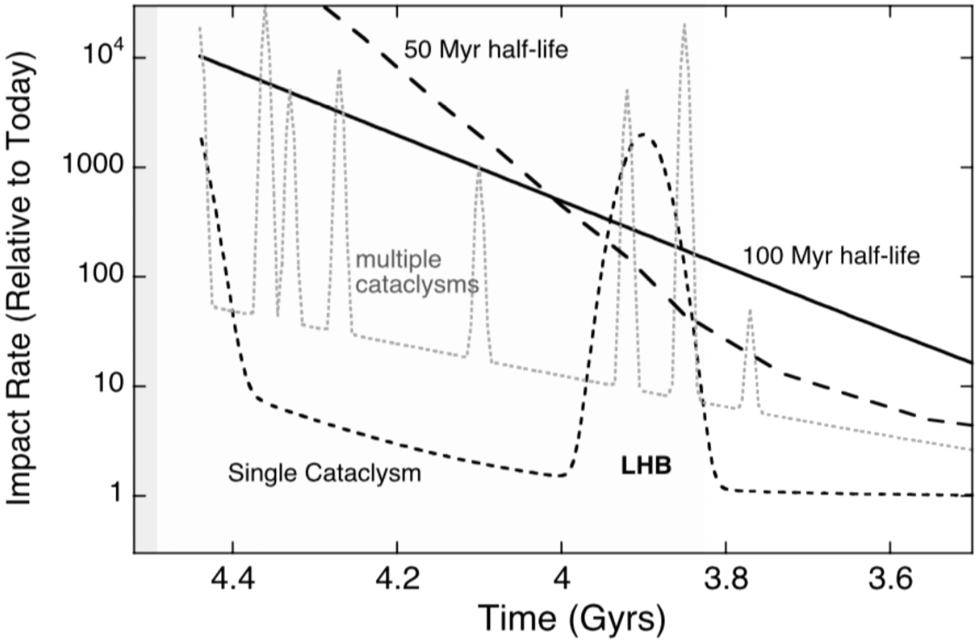

Figura 4.1: Eventos de bombardeamento ocorridos no passado e explicados a partir de dados lunares. Fonte: Zahnle et al., 2007.

Acredita-se que a vida já existia há 300 milhões de anos antes do fim dos eventos de bombardeamentos, devido a análises de fósseis e dados de fracionamento isotópicos de carbono, que foram interpretados como evidências de atividade fotossintética (resíduo de clorofila)(Mojzsis et al., 1996).

Sabe-se que a atmosfera terrestre evoluiu a partir de interações com a biosfera e favoreceu a manutenção de vida complexa na superfície do planeta. O envoltório gasoso primordial provavelmente era redutor e dominado por gases como o CO_2, N_2, mas mecanismos de entrega de conteúdos como vapor de água, CH_4, NH_3, H_2, O_2, CO, H_2S, F_eS, também contribuíram para a complexidade desse envoltório gasoso. Com a evolução do planeta, a atmosfera redutora torna-se oxidante. O elevado conteúdo inicial de dióxido de carbono, estimado em aproximadamente 10 bars (Walker, 1985), provavelmente foi dissolvido nos oceanos e incorporado na formação de carbonatos (Urey, 1952; Zahnle et al., 1988).

O processo de elevação do conteúdo de O_2 na atmosfera ocorreu pela ação de orga-

nismos fotossintetizantes como, por exemplo, as cianobactérias, que iniciaram a produção desse gás há 300 milhões de anos antes da atmosfera tornar-se oxigenada. Estudos de rochas sedimentares pré-cambrianas apontam para o surgimento de uma atmosfera oxidante há aproximadamente 2.4 bilhões de anos (Farquhar et al., 2000). A importância da compreensão da evolução da atmosfera da Terra é importante no estudo do envelope gasoso de exoplanetas, já que esse conjunto de conhecimentos somado aos fatores que determinam os parâmetros otimizados de habitabilidade planetária (tipo espectral da estrela, densidade e raio do planeta, etc.), permitirá a eliminação de informações que levem a interpretações errôneas sobre o observado, além de auxiliar na escolha dos melhores alvos.

Apesar da diversidade das formas e metabolismos, os organismos presentes na Terra compartilham características muito similares que servem como parâmetros importantes para que se entenda sua origem. A grande maioria possui uma alta porcentagem de água em sua constituição, o que fortalece a hipótese que a vida tenha surgido em meio aquoso. Em termos de composição química, eles são constituídos basicamente por quatro elementos químicos: o carbono, o hidrogênio, o oxigênio e o nitrogênio, que são os elementos mais abundantes no Universo (Damineli e Damineli, 2007). A bioquímica da vida é basicamente composta da combinação destes átomos formando água, metano, amônia, dióxido de carbono, açúcares, proteínas, ácidos graxos, etc. Esse panorama sugere que a vida pode ser algo comum e que sob condições adequadas poderá até mesmo ser detectada em várias partes da Galáxia.

As primeiras formas auto-replicantes devem ter surgido em regiões singulares em uma época onde a atmosfera era redutora e o planeta dispunha de algumas fontes de energia (a radiação UV, as atividades vulcânicas, o decaimento radioativo, as altas temperaturas oriundas de impactos constantes e a presença de relâmpagos). Nesse ambiente extremo, é que possivelmente ocorreu a síntese das primeiras moléculas biológicas relevantes para o surgimento da vida. Em laboratório, se uma mistura de gases semelhante ao suposto conteúdo da atmosfera primordial é exposta a radiação UV, observa-se uma síntese molecular composta principalmente por açúcares, aminoácidos, purinas, pirimidinas, nucleotídeos, tioésteres e ácidos graxos; essa mesma mistura gasosa ao ser submetida a condições de alta pressão e temperatura é capaz de produzir piruvatos. É provável que a origem da vida na Terra esteja correlacionada a existência de ambientes extremos semelhantes às fendas hidrotermais (Madigan et al., 2003). Esse cenário favoreceria a existência de micro-organismos

extremófilos tolerantes ao calor (termófilos e hipertermófilos).

Acredita-se que, a partir da polimerização dos blocos fundamentais, foi possível o aparecimento dos polipeptídeos, dos polinucleotídeos e das macromoléculas. Assim, a vida complexa provavelmente se originou seguindo uma trajetória onde a molécula de RNA desempenhou um papel importante. O RNA auto-replicante teria sido aprisionado por estruturas vesiculares lipoprotéicas, formando compartimentos parecidos com as células, porém, sem DNA. A pressão evolutiva por eficiência, menor gasto energético e fidelidade na replicação, fez com que surgisse a molécula de DNA, configurando o que se considera hoje como uma célula moderna, composta principalmente por DNA, RNA e proteínas (Madigan et al., 2003). As figuras 4.2 e 4.3, mostram o processo evolutivo da biosfera terrestre, apresentando o aumento da complexidade biológica, a oxigenação da atmosfera e a diferenciação dos organismos.

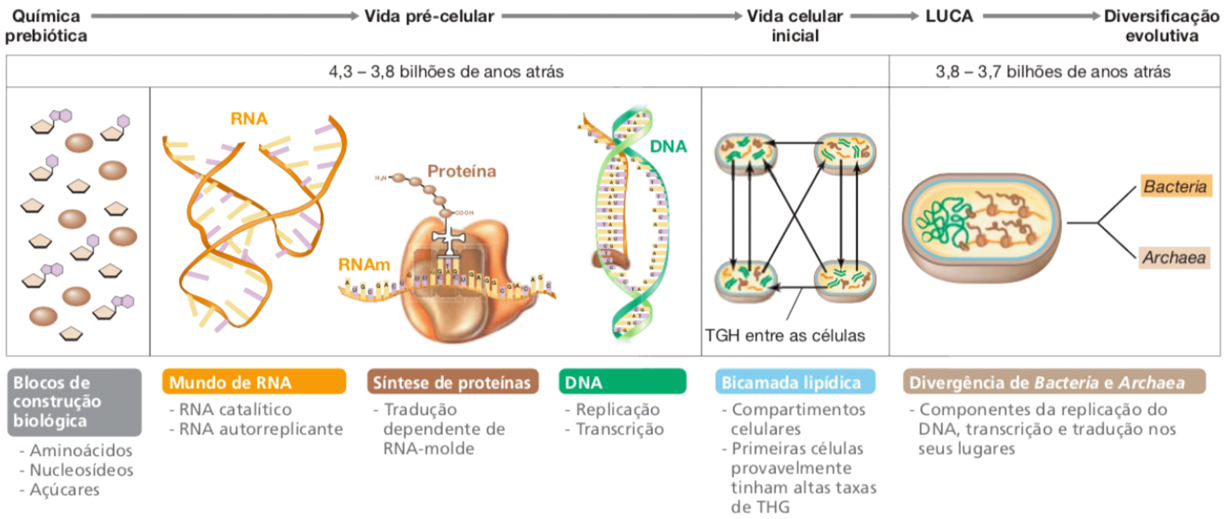

Figura 4.2: Evolução da complexidade biológica. Fonte: Madigan et al., 2003.

O metabolismo dos organismos mais primitivos era baseado na obtenção de energia a partir de mecanismos anóxicos (a obtenção de carbono presente nos componentes celulares certamente ocorreu por meio de sínteses orgânicas abióticas e pela via autotrófica) e restritos a alguns nichos específicos, já que o ambiente era redutor e desprovido de proteção contra a ação da radiação ionizante. O aparecimento das cianobactérias promoveu o acúmulo de oxigênio e consequentemente a modificação atmosférica (vide a evolução da atmosfera na figura 4.3) , possibilitando algumas vantagens ligadas às condições de habitabilidade planetária. O ambiente oxidativo ofereceu uma via energética mais eficiente e a proteção

do material biológico contra a ação da radiação UV (presença do ozônio), possibilitando o aumento, a evolução e a dispersão de organismos pela superfície do planeta (Madigan et al., 2003).

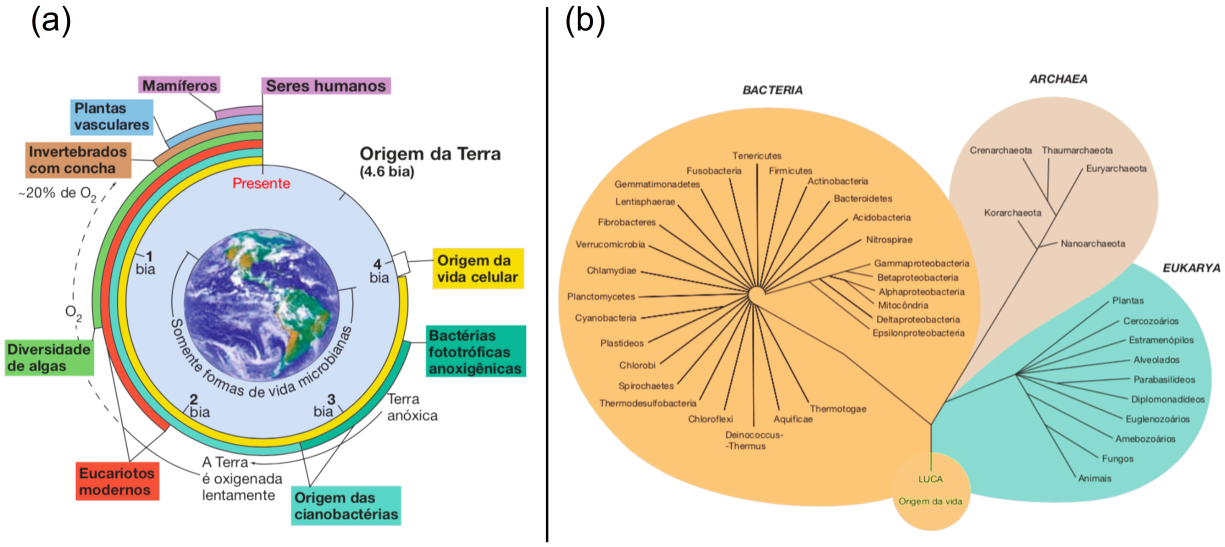

Figura 4.3: Evolução da biosfera terrestre. Em (a) destaca-se a evolução do planeta e a oxigenação da atmosfera. Em (b) aponta-se a diferenciação dos organismos terrestres a partir de um ancestral comum. Fonte: baseado em Madigan et al., 2003.

A tentativa de compreensão de ambientes extraterrestres deve ter como referência a história evolutiva da Terra. Estudos comparativos de sequências de RNA ribossomal, realizados pelo microbiologista americano Carl Woese, definiu os domínios evolutivos utilizados para a classificação dos organismos terrestres. Esses domínios evolutivos que foram denominados como Bactéria, Archaea e Eucária, provavelmente divergiram a partir de um ancestral comum. Dentro dos domínios das bactérias e archaeas, estão as células microscópicas de organização procariótica, isto é, células que não possuem núcleo e organelas, mas que exibem metabolismos diversos e complexos. O domínio das eucárias é formado por organismos unicelulares (protistas) e pluricelulares (plantas, fungos e animais), constituídos por células providas de núcleos, membranas, organelas e citoesqueleto. A figura 4.3 mostra a árvore filogenética da vida e alguns de seus representantes. Nota-se que, a partir de um ponto em comum, há uma divisão bem característica: de um lado as bactérias e do outro as archaeas e eucárias. O objetivo é escolher os melhores representantes dentro dessa divisão (micro-organismos extremófilos), organizar suas principais características e investigar se há traços deles na atmosfera de exoplanetas, a partir da suposição de que esses

ambientes possuem evolução e mecanismos de ejeção de materiais biológicos semelhantes aos terrestres.

4.2 Extremófilos terrestres

Nos últimos anos, muitos micro-organismos foram descobertos e estudados, tendo suas principais características evolutivas catalogadas. Uma parcela muito especial deles, os micro-organismos extremófilos, ao contrário da grande maioria dos organismos terrestres, vivem ou requerem para a sua sobrevivência condições extremas em termos de valores de temperatura, umidade, pressão, salinidade, pH, etc. (Rothschild e Mancinelli, 2001). Devido às suas estratégias de sobrevivência, eles são candidatos naturais a suportarem e terem suportado condições severas como, por exemplo, aquelas encontradas na "Terra primitiva", e talvez estejam espalhados em ambientes extraterrestres onde cenários similares podem ser encontrados. No Sistema Solar, exemplos de ambientes extremos são o planeta Marte (pressão praticamente inexistente, baixas temperaturas, pouca umidade e altos níveis de radiação), o satélite de Saturno Titã (pressão de 1.5 *bars*, baixas temperaturas e superfície com composição de amônia, água e hidrocarbonetos) e a lua de Júpiter, Europa, onde um oceano com temperaturas amenas provavelmente exista (Raulin, 2005). A figura 4.4 mostra algumas características dos extremófilos terrestres, assim como ambientes na Terra e no Sistema Solar onde eles podem ser encontrados.

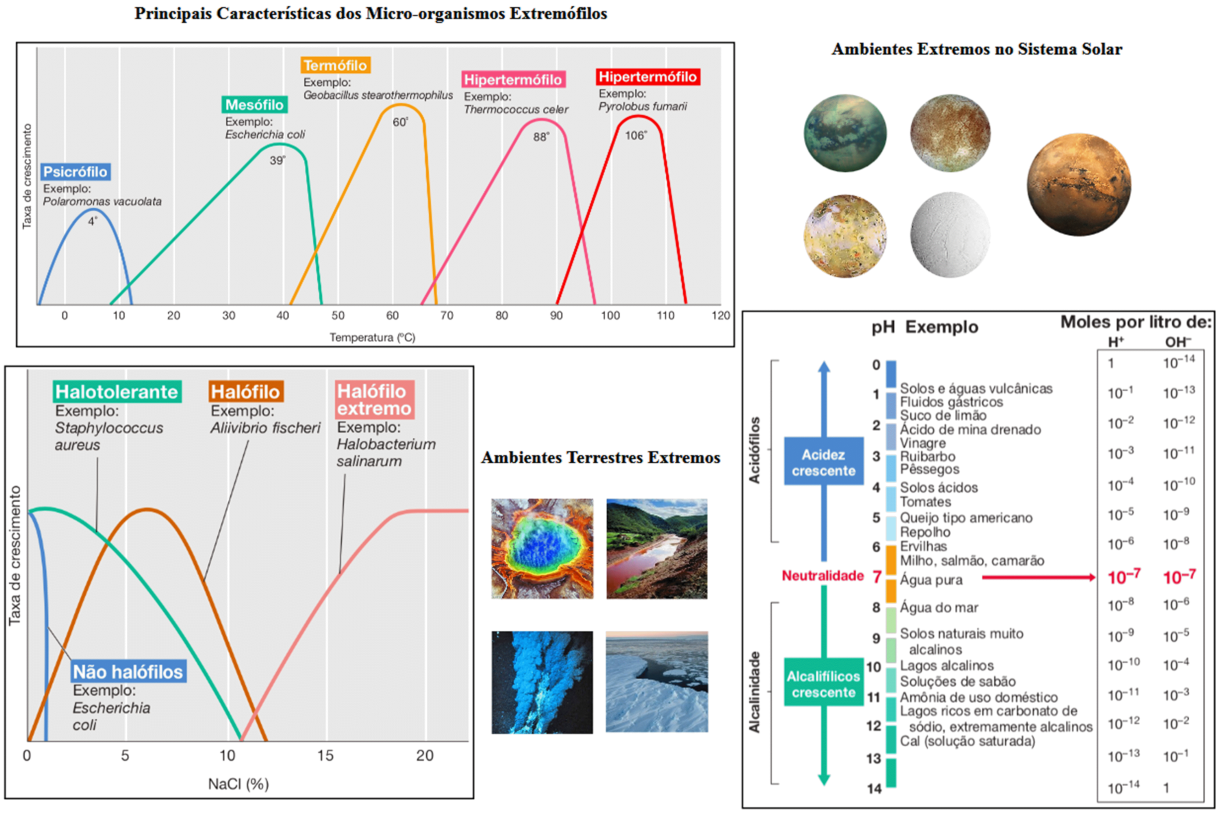

Figura 4.4: Características dos micro-organismos extremófilos e nichos terrestres (localidades onde existem temperaturas elevadas, alta salinidade, alta pressão, vasta faixa de pH e temperaturas baixas) e extraterrestres (Marte e Luas como Titã, Europa, Io e Encedalus) onde eles poderiam sobreviver. Fonte: baseado em Madigan et al., 2003.

A descoberta de micróbios litotróficos, colonizando o interior de rochas, mostrou que há uma incalculável biosfera sob o solo e revelou organismos com metabolismos independentes da luz e de nutrientes líquidos (Pedersen, 1997). É possível que os micro-organismos extremófilos possam, eventualmente, habitar o interior de meteoritos e serem capazes de sobreviver a eventos cataclísmicos (comparados aos de dimensão planetárias), incluindo quedas de objetos celestes. Essas habilidades especiais ainda estimulam a ideia da viabilidade da "litopanspermia": teoria que discute a possibilidade de micro-organismos encrustados em rochas ou em poeira poderem ser transportados de um planeta a outro. Alguns grupos de pesquisa já reportaram evidências experimentais de que alguns extremófilos podem resistir a viagens espaciais quando acoplados dentro de materiais semelhantes a micrometeoritos (Paulino-Lima et al., 2010), assim como a presença deles na atmosfera terrestre (Maki et al., 2008).

Um resumo das principais classes de organismos terrestres é mostrado na tabela 4.1,

onde eles são identificados de acordo com seu habitat natural. Entre esta grande variedade estão alguns extremófilos como as archaeas halofílicas, que se destacam por suas capacidades de sobrevivência em altas concentrações salinas, à exposição de radiação UV e por já terem sido detectadas na atmosfera terrestre (Maki et al., 2008). No decorrer desta pesquisa, a archaea *Halobacterium salinarum* será usada como modelo para confrontação de espectros obtidos em laboratório com o espectro real da atmosfera terrestre.

Tabela 4.1 - Classe de alguns organismos terrestres (incluindo os micro-organismos extremófilos), principais características de sobrevivência e ecossistemas onde são encontrados.

Organismos terrestres				
Parâmetros do Ecossistema	Classe	Sobrevivência	Ecossistema	Exemplo
Temperatura	Mesófilo	$15 - 50$ ^oC	Superfície	*Homo sapiens*
Temperatura	Termófilo	$60 - 80$ ^oC	*Geysers* (*Eellowstone*)	*Synechococcus lividus*
Temperatura	Hipertermófilo	Acima 80 ^oC	Ventos hidrotermais	*Pyrolobus fumarii*
Temperatura	Pisicrófilo	Abaixo 15 ^oC	Lagos (*Vostok*)	*Psychrobacter*
pH	Acidófilo	Baixo pH	Minas ácidas	*Cyanidium caldarium*
pH	Alcalino	pH >9	Lagos (soda)	*Natronobacterium*
Salinidade	Halófilo	$2 - 5M$ NaCl	Minas de sal	*Halobacterium salinarum*
Pressão	Piezofílico	Alta pressão	Subsuperfícies	*Escherichia coli*
Radiação	Radioresistente	Alta dose	Reatores nucleares	*Deinococcus radiodurans*
Umidade	Xerófilo	Pouca água	Herbaria	*Artemia salina*

4.3 *Halobacterium salinarum*

O termo halofílico é usado para se referir a organismos que vivem em altas concentrações salinas (geralmente maiores que 1.5 M NaCl). Representantes desse grupo já foram encontrados em ambientes como o mar morto, minas de sal, isolados de rochas salinas com idades geológicas consideráveis ($195 - 250$ milhões de anos) e até mesmo em lagoas localizadas em regiões secas da Antártica (Oren e Dubinsky, 1994; Benlloch et al., 2001; Stan-Lotter et al., 1999; Gramain et al., 2011; Franzmann et al., 1988). Micro-organismos halofílicos já foram detectados em estrematólitos modernos e, como já mencionado, também na atmosfera da Terra (Nicholson et al., 2000; Maki et al., 2008; Goh et al., 2006), o que os tornam objetos de estudo ideais para esta pesquisa.

As archaeas deste grupo possuem características peculiares, tais como a pigmentação rosa, laranja ou vermelha, enzimas específicas para adaptação a ambientes salinos, uma única bomba de prótons que é dirigida pela luz solar, além de serem resistentes à radiação; possuem ainda variações em sua morfologia, podendo ser encontradas na forma de bastonetes, cocos, formas pleomórficas irregulares ou na forma de células quadráticas quase

perfeitas (Fendrihan et al., 2006). A figura 4.5 mostra a imagem da archaea *Halobacterium salinarum* e alguns nichos onde ela é encontrada.

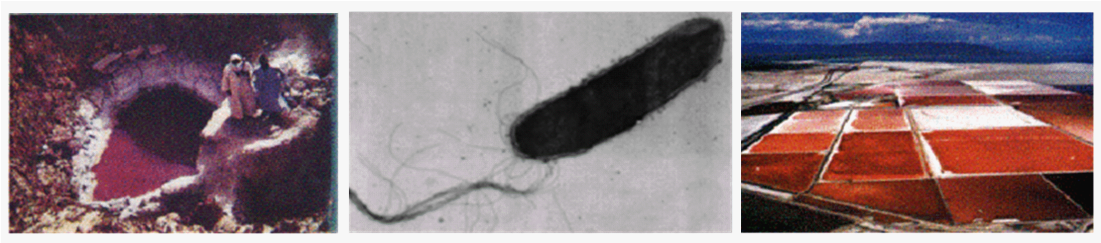

Figura 4.5: Halobacterium salinarum e nichos salinos onde elas são encontradas. Fonte: `http://www.biochem.mpg.de/522218/Org_Hasal`. Acesso em 10 jul. 2018.

4.4 Habitabilidade e organismos halofílicos

A proposta da utilização de micro-organismos halofílicos como modelo para este estudo, particularmente a archaea *Halobacterium salinarum*, é sustentada pelo argumento de que sua possível detecção está condicionada somente a três fatores: a presença de água, sal e mecanismos capazes de ejetá-la da superfície em direção a atmosfera ou do interior de um objeto rumo ao meio exterior (planeta, satélites naturais, cometas). A hipótese pode ser viável já que se sabe que a Terra passou, ao longo de sua evolução, por diversos episódios de sedimentação de halites (sal de rocha de origem sedimentar constituído principalmente de cloreto de sódio, mas com traços de iodo, bromo, ferro, flúor e silício) e outros minerais oriundos de ambientes marinhos hipersalinos (Zharkov, 1981). Sabe-se, ainda, que outros ambientes do Sistema Solar podem abrigar nichos, onde a presença de água e consequentemente a existência de sal pode ser comum. Marte, por exemplo, pode ter apresentado condições iguais às terrestres (quente e úmido), sugerindo a possibilidade de existência de imensas concentrações de sal onde micro-organismos podem, eventualmente, estarem dormentes (Beaty et al., 2005; Nisbet e Sleep, 2001; Landis, 2001). A figura 4.6 mostra ambientes dentro do Sistema Solar onde moléculas complexas ou mesmo micro-organismos halofílicos podem existir.

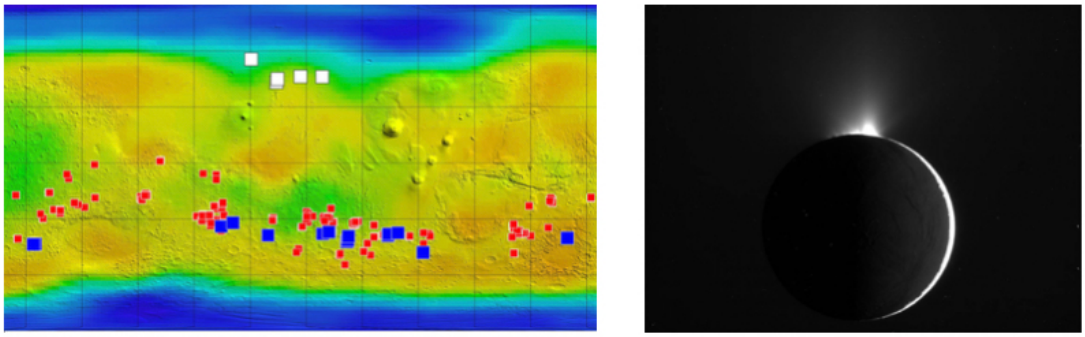

Figura 4.6: Ambientes dentro do Sistema Solar onde possivelmente há condições para a existência de micro-organismos halofílicos. A figura à esquerda aponta locais em Marte onde foi reportado indícios da provável presença de gelo, água ou sal. A figura à direita mostra jatos contendo particulados de gelo sendo emitidos pelo satélite natural Encedalus. Fonte: `https://mars.nasa.gov/resources/3578/ice-salt-and-warm-season-flows-on-mars/` e `https://www.nasa.gov/feature/jpl/enceladus-jets-surprises-in-starlight`. Acesso 10 jun. 2018.

Quando se pensa em posições orbitais mais afastadas, ou seja, distâncias além da Zona Habitável do Sistema Solar, dois satélites naturais dos planetas gigantes gasosos, Júpiter e Saturno, chamam a atenção: Europa e Enceladus. Europa possui uma superfície inabitada, mas abriga um vasto oceano de água salgada que, provavelmente, recebe energia por meio de forças de maré e pode oferecer condições otimizadas para o desenvolvimento da vida (Brown e Hand, 2013; Chyba, 2000). Enceladus, por sua vez, deve abrigar um enorme oceano abaixo de sua cobertura de gelo. Imagens da missão *Cassini* mostram jatos finos de partículas de gelo que emergem de seu polo sul. Esses jatos deram origem a uma extensa pluma que pode ser observada no espaço, indicando evidências da existência de moléculas orgânicas essenciais ao desenvolvimento da vida (McKay et al., 2008; Porco et al., 2006; Bedrossian et al., 2017). Caso seu oceano realmente exista, ele deverá ser salino e também aquecido por forças de maré (Zolotov, 2007).

Outra hipótese que não pode ser descartada, refere-se à ideia da presença de micro-organismos halofílicos no espaço. Alguns estudos indicam que archaeas halofílicas poderiam se mover no meio interplanetário aprisionadas em estruturas como os halites. Entretanto, há uma lacuna a ser preenchida no que diz respeito à sobrevivência desses micro-organismos às condições adversas de ejeção e reentrada planetária (Zolensky et al., 1999; Whitby et al., 2000; Rubin et al., 1998).

Todos os argumentos e estudos citados anteriormente reforçam a escolha da *Halobac-*

terium salinarum como organismo modelo da metodologia empregada nesta pesquisa.

Capítulo 5

Resultados e discussões

Discute-se aqui todas as etapas do projeto, a metodologia utilizada e as evidências de contaminação da atmosfera terrestre por materiais biológicos provenientes de estruturas complexas de micro-organismos. Essa constatação aponta para a viabilidade de detecção remota de bioassinaturas em exoatmosferas de planetas semelhantes à Terra. Há uma parte dedicada à discussão das ações futuras, que deverão ser implementadas com o objetivo de completar este estudo.

5.1 Objetivos dos experimentos

O objetivo central desta tese é comparar dados espectroscópicos de materiais biológicos, obtidos em laboratório, com outros oriundos da observação direta da atmosfera terrestre. Para tal fim, vários experimentos foram planejados e testados ao longo de aproximadamente quatro anos. Durante esse período, vários laboratórios de diferentes instituições de pesquisa foram utilizados e várias técnicas de espectroscopia empregadas, com o propósito de se obter espectros com qualidade suficiente para serem utilizados nesta comparação.

Abaixo há uma descrição da metodologia empregada e uma análise dos resultados obtidos nesta investigação, assim como uma discussão das possíveis implicações desses estudos.

5.2 Escolha do micro-organismo utilizado como referência nesta pesquisa

Com a finalidade de obter informações sobre as principais bandas de absorção oriundas de materiais biológicos como o DNA e as células suspensas, selecionou-se alguns organismos para estudo. A tabela 5.1 mostra os representantes selecionados.

Tabela 5.1 - Micro-organismos selecionados para estudo.

Micro-organismos	
Nome	Característica de interesse
Escherichia coli	Comum em diversos ambientes terrestres
Deinococcus radiodurans	Resistência a radiação / Caroteno
Pseudomonas fluorescens	Secreção do pigmento pioverdina
Rahnella aquatilis	Anaeróbio facultativo que fixa nitrogênio
Clavibacter michiganensis	Encontrada em plantações / sobrevivência em clima seco e frio
Synechococcus sp.	Pigmento clorofilado
Atacama soil T1	Clima seco / análogo ao clima de Marte
Haloferax sp.	Ambientes aquáticos de alta salinidade
Halobacterium salinarum	Encontrada em lagos hipersalinos e salinas / resistente a radiação

A ideia inicial era selecionar micro-organismos pertencentes a diferentes nichos terrestres e caracterizá-los espectroscopicamente. No entanto, devido a problemas técnicos com o equipamento de espectroscopia, que impossibilitou a realização dos trabalhos durante o período de 8 meses, optou-se pela escolha de apenas um organismo para dar sequência ao projeto. Apesar da escolha, outras análises vêm sendo realizadas com o objetivo de se montar uma biblioteca de espectros.

5.3 Testes preliminares e definição da metodologia experimental

A primeira ação experimental ligada ao escopo deste projeto ocorreu no Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. Nessa etapa, o objetivo principal foi a preparação de amostras biológicas, contendo DNA e células suspensas de micro-organismos extremófilos, aptas a serem analisadas por meio da técnica de espectroscopia. A tabela 5.2 mostra o material preparado.

Tabela 5.2 - Principais características das amostras preparadas no Instituto Oceanográfico para a realização das análises espectroscópicas.

Micro-organismos		
Material Biológico	DNA/Células suspensas	Concentração ($ng/\mu l$)
Deinococcus radiodurans	DNA purificado	39.7
Deinococcus radiodurans	Células suspensas	16.1
Exiguo antarcticum	DNA purificado	29.5
Exiguo antarcticum	Células suspensas	3.6
Haloferax sp.	DNA purificado	46.2
Haloferax sp.	Células suspensas	15.7
Escherichia coli DH5 alpha	DNA purificado	137.7
Escherichia coli DH5 alpha	Células suspensas	88.6

Vale ressaltar que, os processos de isolamento e purificação de DNA, realizados neste

trabalho, seguiram o protocolo *DNeasy Blood and Tissues kit* (*Qiagen*). O processo consiste na análise das células por meio da utilização de tampão de extração com proteinase k e a incubação da amostra em banho-maria a 55 ^{o}C por um tempo entre 3 e 4 horas. As amostras foram purificadas em uma coluna *spin* que continha uma membrana de sílica-gel. Em seguida, o DNA foi armazenado em água ultrapura e quantificado por espectroscopia óptica (*Nanodrop*).

As amostras apresentadas na tabela 5.2 foram armazenadas e depois transportadas para o laboratório de materiais do Instituto de Estudos Avançados (IEAv-ITA) em São José dos Campos, que cedeu suas instalações para a realização do experimento. As condições de armazenamento e transporte seguiram os protocolos tradicionais utilizados pelo Instituto Oceanográfico e eram ideais para a garantia da integridade das amostras. Para a análise espectroscópica foi utilizado espectrofotômetro *Jasco V570*, capaz de realizar medidas na região compreendida entre 190 nm até 2500 nm, operando no modo de transmitância. Os resultados obtidos são apresentados nas figuras 5.1 e 5.2.

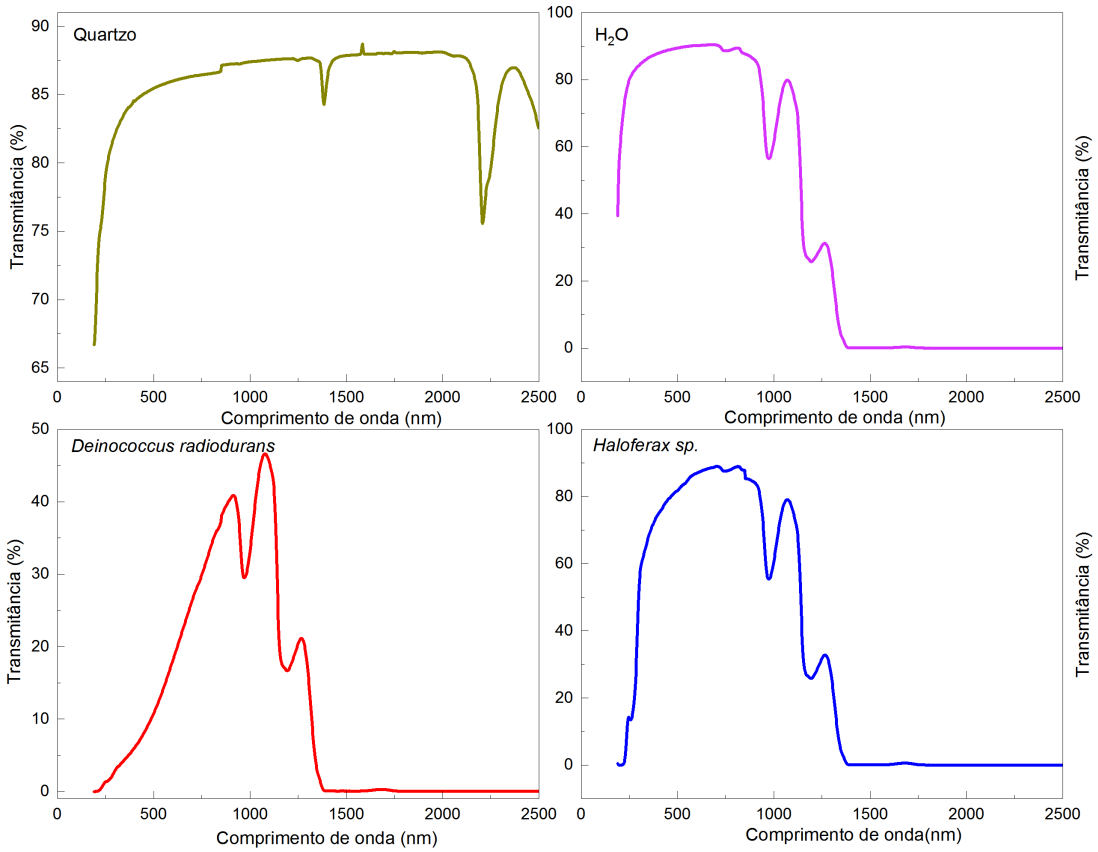

Figura 5.1: Espectro das amostras biológicas contendo DNAs e células suspensas dos microorganismos *Haloferax sp.* e *Deinococcus radiodurans*, além dos espectros do quartzo e da água.

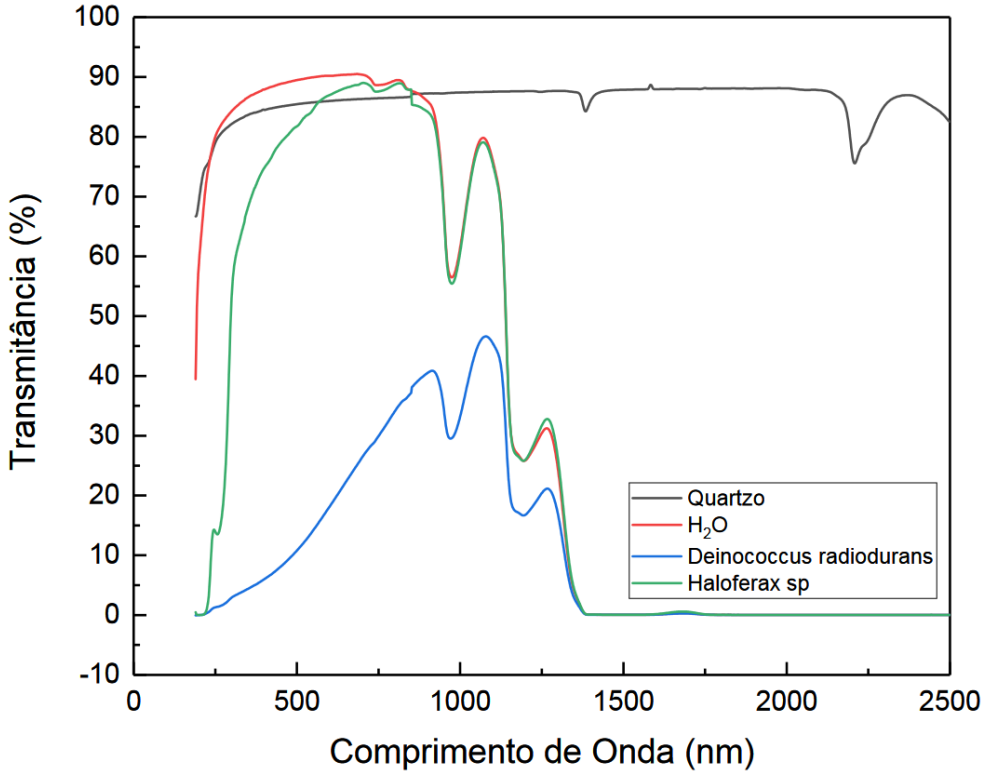

Figura 5.2: Junção dos espectros dos DNAs e células suspensas dos micro-organismos *Haloferax sp.* e *Deinococcus radiodurans* mais os espectros da água e do quartzo.

A partir das análises espectrais das amostras contendo os micro-organismos *Haloferax sp.* e *Deinococcus radiodurans*, obtidas no IEAv e que cobriram uma faixa espectral compreendida entre $190 - 2500$ nm, concluiu-se que, em concentrações baixas (da ordem de $ng/\mu l$) o feixe de luz foi simplesmente atenuado, sendo praticamente impossível identificar uma assinatura biológica. Percebeu-se, também, que o sinal encontrado é devido à absorção da água e que o equipamento e o método utilizados para as medidas desse tipo de material biológico não eram adequados.

A próxima etapa da pesquisa contou com a colaboração da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que cedeu a estrutura de um dos seus laboratórios de microbiologia para que novas amostras fossem preparadas, particularmente, aquelas contendo células suspensas e DNA do micro-organismo *Halobacterium salinarum*. Além dessa colaboração, outra com o Instituto de Química da USP de São Carlos foi firmada, objetivando o aprendizado e a utilização das técnicas desenvolvidas em seus laboratórios de espectroscopia.

Os resultados das medidas realizadas em São Carlos não foram satisfatórios e mostraram que a técnica espectroscópica utilizada não era adequada para as necessidades do projeto.

Observou-se que o procedimento requeria grandes quantidades de amostra e, que em baixas concentrações (da ordem $ng/\mu l$), a influência da água ainda era observada, impossibilitando a identificação de bandas características do DNA e das células suspensas. A figura 5.3 mostra parte dos testes realizados no Instituto de Química de São Carlos com a utilização de um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, da marca *Shimadzu* e modelo *IRAffinity 1*.

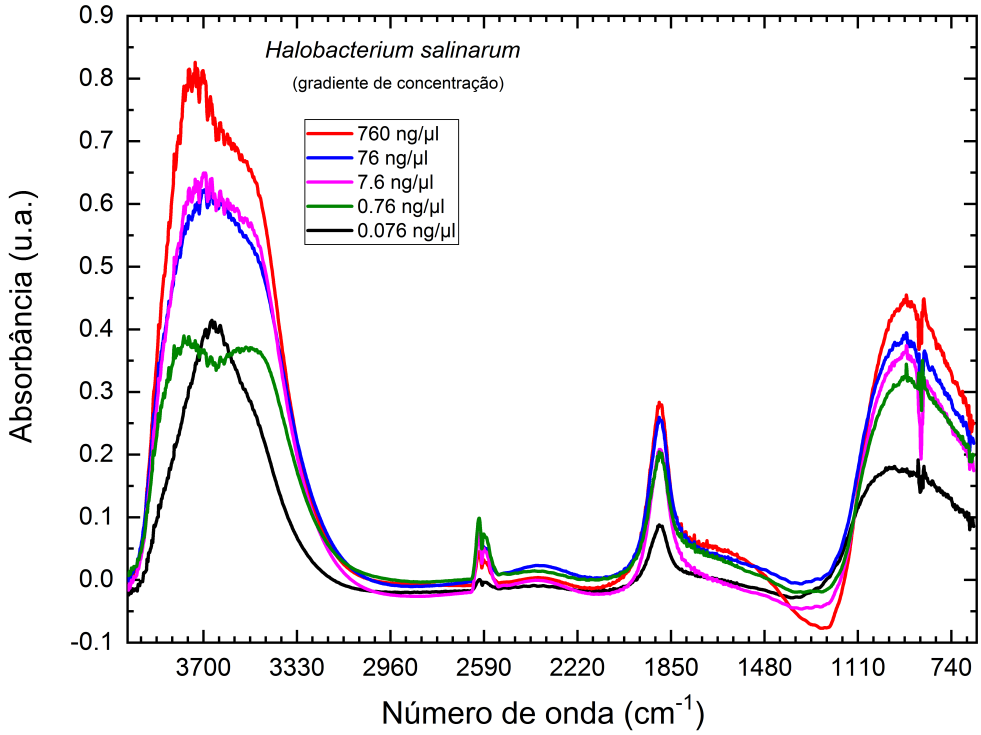

Figura 5.3: Espectro de Absorbância de algumas amostras biológicas contento DNA do micro-organismo *Halobacterium salinarum* purificado e em diversas concentrações ($600 - 4000\ cm^{-1}$).

Considerando os resultados insatisfatórios das primeiras tentativas de caracterização das amostras, foi necessária a busca de uma nova colaboração com institutos especializados na pesquisa de materiais orgânicos como DNA e células suspensas de micro-organismos. Essa etapa do projeto ocorreu no laboratório de Bio-Medicina da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Assim, algumas amostras foram submetidas a novos testes e análises espectroscópicas na região do infravermelho do espectro eletromagnético. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro *Perkin Elmer Spotlight 400 Séries*, com resolução variável de 16 a 0.50 cm^{-1}, que cobre uma faixa espectral desde 8000 até 30 cm^{-1}. O resultado do experimento foi satisfatório e a figura 5.4 mostra um dos espectros obtidos; ele faz parte de uma biblioteca de espectros de micro-organismos que está sendo organizada.

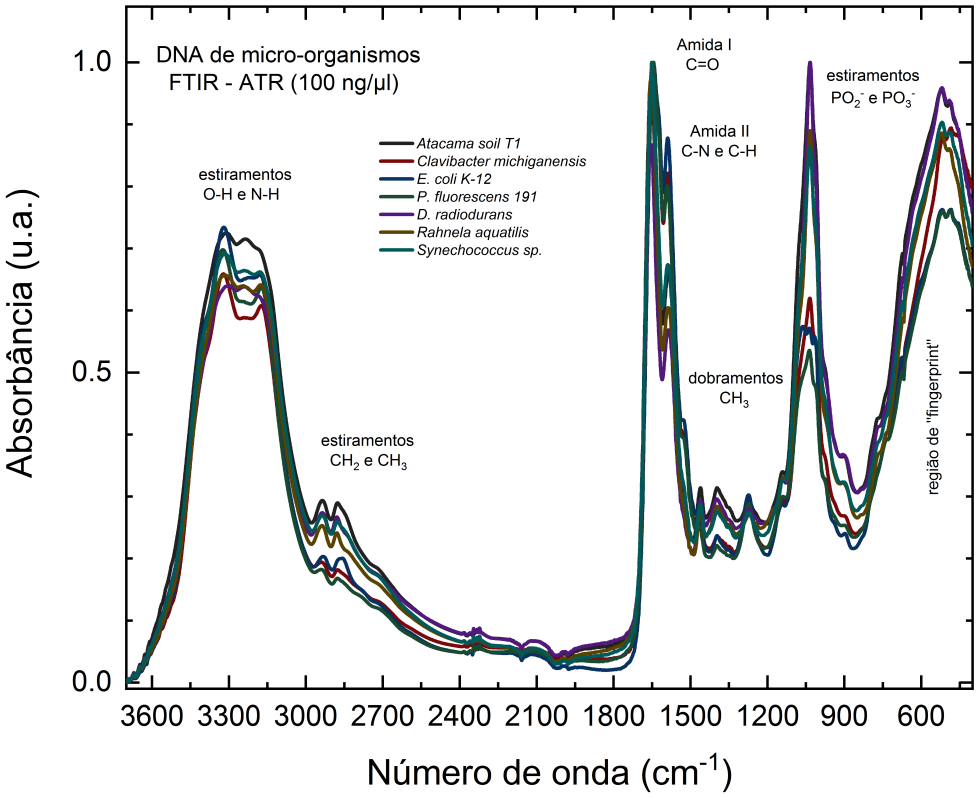

Figura 5.4: Espectro de absorbância de amostras biológicas contento DNA de alguns micro-organismos estudados nesta pesquisa. O método utilizado para a realização do espectro foi FTIR-ATR.

O espectro da figura 5.4 já evidencia algumas bandas características da molécula de DNA como, por exemplo, as bandas das amidas I e II. A partir da ciência de que a caracterização de traçadores biológicos era possível, um protocolo experimental foi idealizado e novas amostras foram preparadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sendo apresentadas na tabela 5.3. Elas foram obtidas para a caracterização do micro-organismo *Halobacterium salinarum*.

Tabela 5.3 - Concentrações de algumas amostras contendo DNA extraídos e purificados do micro-organismo *Halobacterium salinarum* (trabalho realizado em colaboração com a FMRP-USP).

Amostras do micro-organismo *Halobacterium salinarum* (DNA)			
Amostra	Concentração ($ng/\mu l$)	260/280	260/230
	($1-3$ medidas)	($1-3$ medidas)	($1-3$ medidas)
1	427; 429	1.8; 1.7	1.2; 1.2
2	576; 590	1.7; 1.7	1.2; 1.2
3	678; 678	1.7; 1.8	1.1; 1.3
4	854; 838; 845	1.8; 1.7; 1.7	1.1; 1.1; 1.1
5	561; 737	1.8; 1.8	1.2; 1.1
6	523; 563	1.7; 1.7	1.1; 1.2
7	533; 548	1.7; 1.7	1.1; 1.3
8	351; 329	1.7; 1.6	1.1; 1.2
9	520; 539	1.7; 1.7	1.2; 1.2
10	505; 501	1.6; 1.7	1.1; 1.2
11	417; 429	1.7; 1.7	1.4; 1.6
12	302; 317	1.8; 1.8	1.7; 1.6
13	408; 430	1.7; 1.7	1.4; 1.4
14	329; 369	1.8; 1.7	1.6; 1.6
15	512; 526	1.7; 1.7	1.2; 1.3
16	593; 603	1.8; 1.8	1.6; 1.5
17	617; 602; 628	1.7; 1.7; 1.7	1.2; 1.1; 1.2
18	786; 805	1.7; 1.8	1.4; 1.4
19	653; 647	1.7; 1.7	1.2; 1.1
20	624; 632	1.8; 1.7	1.4; 1.5
21	713; 729	1.7; 1.8	1.2; 1.2
22	770; 816; 799	1.8; 1.8; 1.8	1.4; 1.4; 1.4
23	611; 593	1.8; 1.7	1.2; 1.2
24	769; 797; 766	1.6; 1.8; 1.7	1.2; 1.2; 1.1
25	700; 738	1.7; 1.7	1.2; 1.1

De posse das amostras contidas na tabela 5.3, foram preparadas outras contendo 760 $ng/\mu l$, 540 $ng/\mu l$, 100 $ng/\mu l$, 76 $ng/\mu l$, 7.6 $ng/\mu l$, 0.76 $ng/\mu l$ e 0.076 $ng/\mu l$ de DNA da archaea *Halobacterium salinarum*. Por meio dessas novas concentrações, foi possível a obtenção de um gradiente, que forneceu informações importantes sobre a relação intensidade de sinal versus massa de material biológico (vide tabela 5.9 e figuras 5.17 e 5.21).

As células suspensas do micro-organismo *Halobacterium salinarum NRC-1*, utilizadas nesta pesquisa, foram obtidas usando o protocolo cedido pelo laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). O cultivo foi realizado em meio nutriente (CM) composto por NaCl 250 g/l, MgSO4.7H2O 20 g/l, KCl 2 g/l, citrato de sódio 3 g/l, peptona 10 g/l e água destilada. O processo ocorreu no laboratório em estufa a 37 ^{o}C, sob condições de alta luminosidade e agitação entre 125 e 250 rpm. O procedimento foi finalizado quando se atingiu a fase exponencial de crescimento ($D.O.600nm = 0.5$).

A figura 5.5 sintetiza o protocolo utilizado para a obtenção dos espectros infravermelhos

dos micro-organismos extremófilos, que serão utilizados para a comparação com espectros obtidos da atmosfera terrestre por meio de observações de solo (Observatório Paranal localizado no deserto do Atacama).

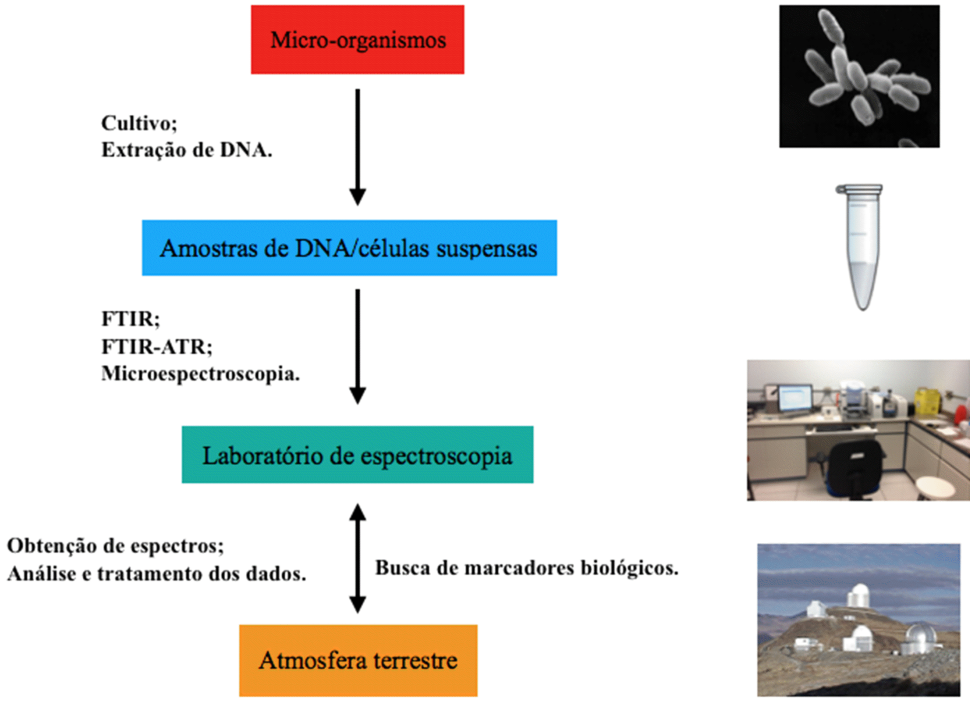

Figura 5.5: Esquema dos procedimentos experimentais adotados para obtenção dos espectros dos micro-organismos.

Após os conteúdos de DNA e células suspensas dos micro-organismos serem obtidos, eles foram encaminhados ao laboratório de espectroscopia e submetidos à análise por meio de três técnicas espectroscópicas distintas: espectroscopia FTIR (transmissão), FTIR-ATR e microespectroscopia (transmissão). Tais técnicas podem oferecer informações particulares sobre uma determinada região e a soma delas é um fator importante na tentativa de caracterização dos materiais. A figura 5.6 mostra a interseção das técnicas para o espectro da molécula de DNA do micro-organismo *Halobacterium salinarum*.

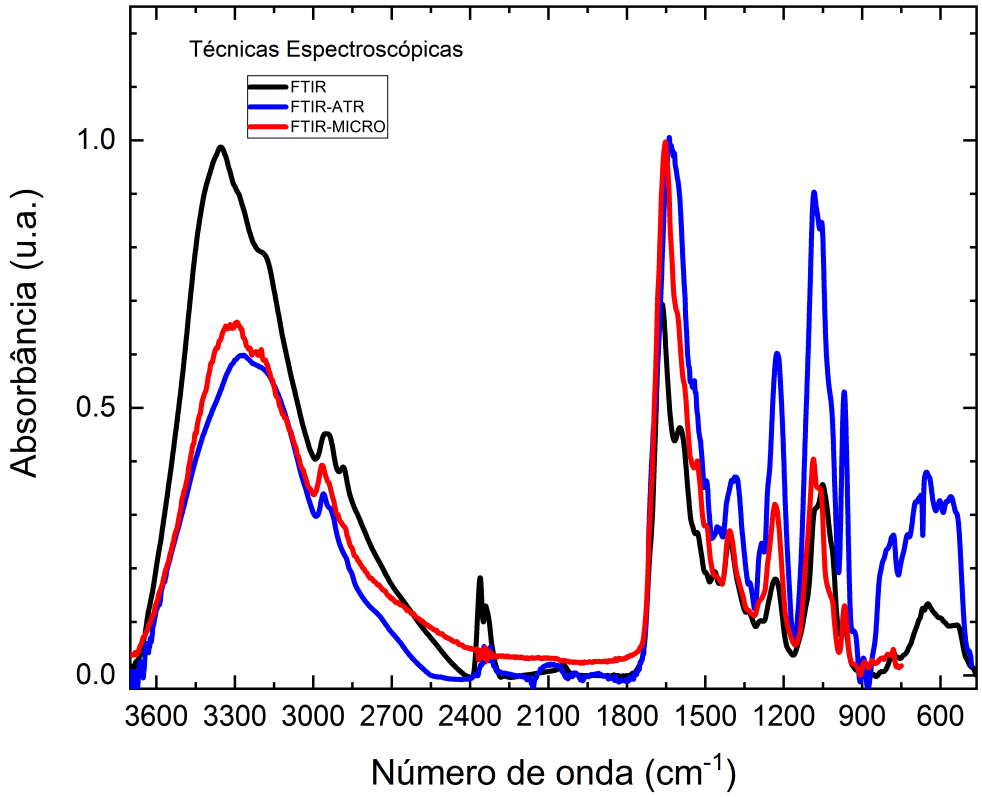

Figura 5.6: Interseção dos espectros de DNA do micro-organismo *Halobacterium salinarum* obtidos pelas técnicas FTIR, FTIR-ATR e microespectroscopia (transmissão).

Nota-se que a técnica de microespectroscopia por transmissão oferece um ganho de informação (contorno das bandas de baixa intensidade) na região do espectro compreendida entre 1000 e 750 cm^{-1}. As outras regiões do espectro são praticamente iguais, apenas com pequenos deslocamentos na posição de algumas bandas. Além dos espectros do micro-organismo, foi obtido também um conjunto de espectros dos solventes usados nos experimentos. O objetivo desse procedimento foi evitar falsas atribuições. Esses espectros são mostrados na figura 5.7.

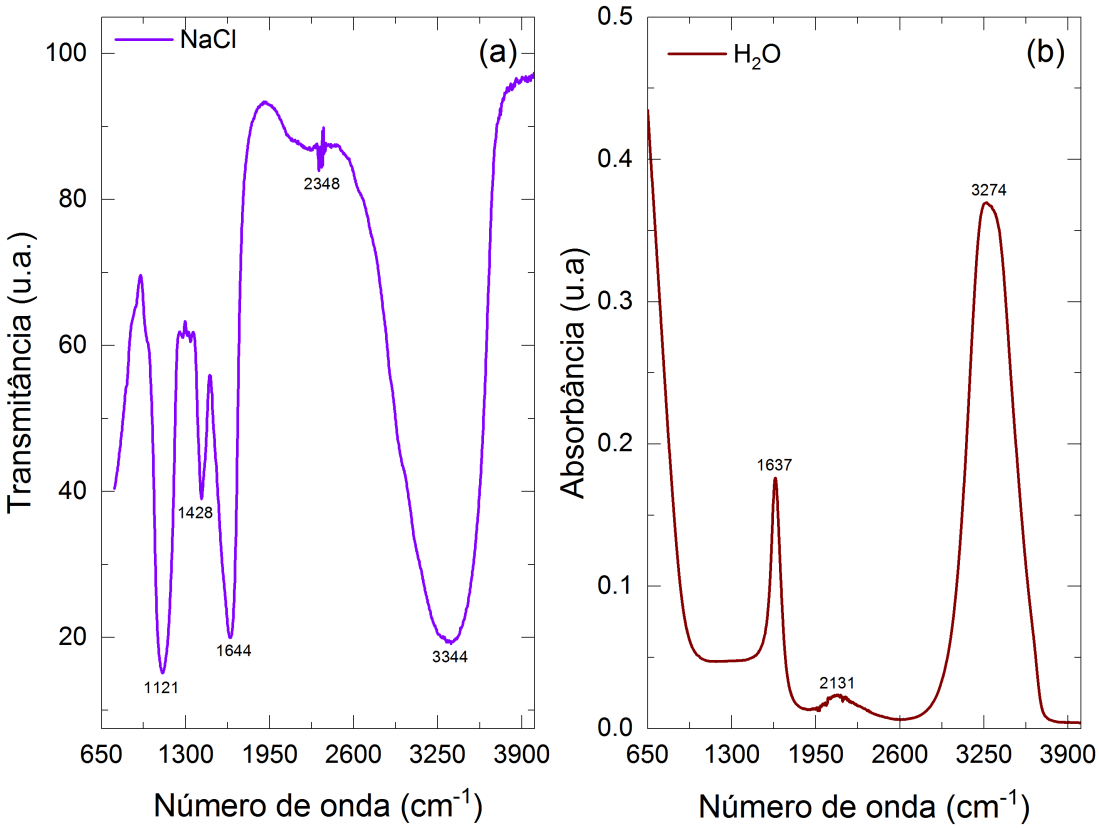

Figura 5.7: Espectros das soluções aquosas e salinas utilizadas nos experimentos.

Quando a comparação direta não é capaz de indicar similaridades entre dois espectros, ainda há possibilidades de utilização de técnicas e procedimentos matemáticos para tal finalidade. O tratamento dos espectros pode ser feito por meio da Análise de Componentes Principais (PCA), da análise por *Cluster* e utilizando-se o processo de Deconvolução. Vários softwares comerciais e não comerciais podem ser utilizados para a implementação dos métodos citados, entretanto, optou-se pelo *Spectrum* 5.3, o *Origin* 9.0 e o *Minitab* 17.

5.4 Análise da atmosfera terrestre

Com o objetivo de comparar o espectro da atmosfera terrestre com os espectros do micro-organismo *Halobacterium salinarum* obtidos em laboratório, uma missão observacional foi proposta e executada em conjunto com colaboradores franceses. O objetivo era o de confrontar os espectros e tentar identificar alguma similaridade. Um espectro real e não sintético da atmosfera terrestre foi obtido. Os dados foram obtidos do arquivo do *European Southern Observatory* (`http://archive.eso.org/cms.html`) e, para fins de comparação

com os espectros laboratoriais de FTIR, eles foram extraídos do *VLT Imager and Spectrometer* para infravermelho médio (VISIR), acoplado a um dos telescópios *Very Large* de 8.2 m localizado no observatório Paranal. O observatório Paranal do ESO situa-se no deserto do Atacama, em uma montanha de 2600 metros de altitude, aproximadamente 130 km ao sul de Antofagasta, no Chile, 12 km ao interior da costa do Pacífico, em uma das regiões mais secas do mundo.

O modo espectral de baixa resolução foi escolhido, gerando uma região de comprimento de onda compreendida entre o intervalo 84 a 13 mícrons (769.23 a 1250 cm^{-1}) centrada em 10.42 mícrons (959.69 cm^{-1}). Com o objetivo de integrar o máximo de atmosfera possível, optou-se por adquirir dados que contivessem a maior quantidade de massa de ar. Assim, foram escolhidas observações realizadas em $2015 - 08 - 04$ às $23 : 01 : 27$ TU, com ascensão reta $10 : 50 : 55.0$ e declinação $-12 : 26 : 00.8$, o que forneceu uma massa de ar de 2.55, que representa cerca de 30 km de camada atmosférica. A redução de dados foi realizada com o pacote *ESO-Reflex* (`http://www.eso.org/sci/software/esoreflex/`), assim como com a utilização do pacote *Kepler workflow* (`https://kepler-project.org`). Esse método permite a extração e calibração dos comprimentos de onda do espectro alvo, além de remover o espectro de fundo do céu. Por meio do pacote de redução de dados, foi possível obter o espectro calibrado apresentado na figura 5.8.

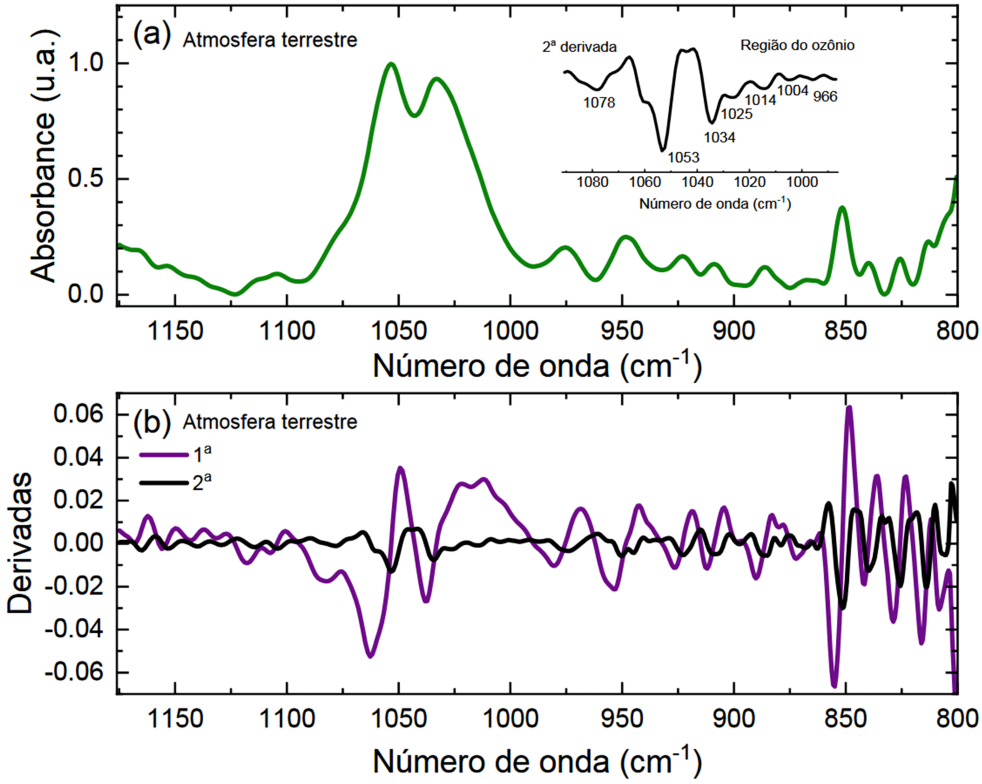

Figura 5.8: Espectro da atmosfera terrestre. (a) Espectro da atmosfera terrestre com destaque para a região espectral do ozônio. (b) Testes de primeira e segunda derivadas aplicadas ao espectro.

A observação direta do espectro revela a eloquente banda atribuída à presença de ozônio, que cobre a faixa espectral entre aproximadamente 1092 e 989 cm^{-1}. Essa banda larga do ozônio foi submetida ao teste de segunda derivada, o que ainda revelou outras absorções, que podem ser conferidas na figura 5.8 (a). Algumas delas coincidem com absorções atribuídas a componentes biológicos como, por exemplo, o pico em 966 cm^{-1}, que é atribuído a vibrações de estiramento do tipo C-C e C-O ligadas à presença da ribose. Realizou-se, quando necessário, a deconvolução de partes do espectro da atmosfera terrestre. A região que engloba a banda de ozônio é apresentada na figura 5.9, assim como alguns resultados da análise deste intervalo são expostos na tabela 5.4.

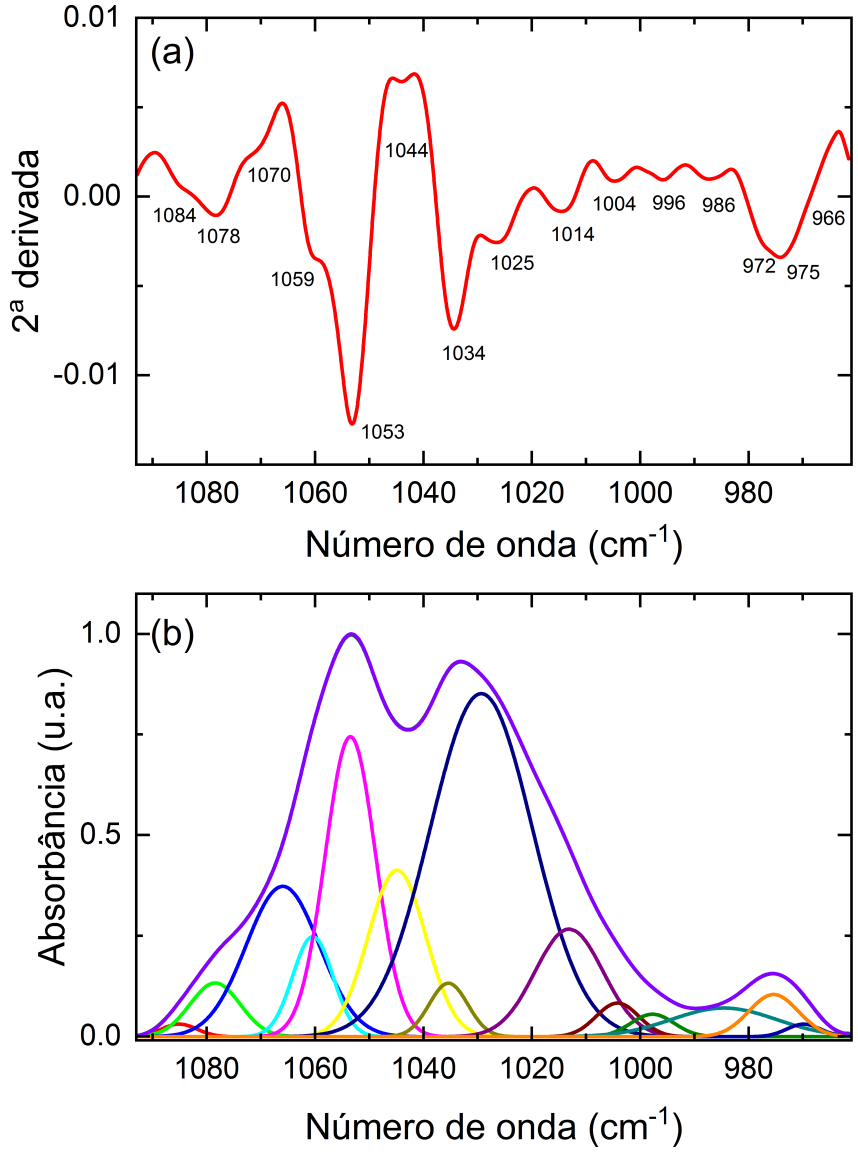

Figura 5.9: Espectro da atmosfera terrestre. (a) Teste de segunda derivada de parte do espectro terrestre. (b) Deconvolução por aproximação Gaussiana.

Tabela 5.4 - Deconvolução de parte do espectro da atmosfera terrestre por meio de aproximação Gaussiana. A região espectral analisada compreende o intervalo de 1093 a 961 cm^{-1}.

Deconvolução do espectro da atmosfera terrestre						
Absorções		Área		Largura Média		Absorções 2ª derivada
Valor (cm^{-1})	Erro padrão	Valor	Erro Padrão	Valor	Erro Padrão	Valor (cm^{-1})
1085	144.94	0.26	0.58	770.66	206.15	1084
1078	379.36	155.11	526.59	1.090.46	87.82	1078
1065	990.81	635.29	1.780.07	1.596.73	3.131.95	1070
1060	0.56	231.87	65.27	875.512	2.54	1059
1053	178.38	870.80	642.15	1.097.53	178.21	1053
1044	335.46	550.87	515.24	1.250.07	404.19	1044
1035	0.36	119.08	104.42	840.41	0.99	1034
1029	0.55	2.019.01	1.025.65	2.224.59	936.30	1025
1013	163.03	420.83	528.88	1.477.09	465.26	1013
1004	0.79	0.83	0.83	928.95	201.79	1004
997	164.74	0.56	0.41	936.88	187.02	996
985	185.14	172.86	0.05	2.275.51	159.78	986
969	0.37	0.25	0.16	743.02	0.76	966
975	0.51	120.09	0.30	1.074.30	112.39	975

A tabela 5.4 traz informações sobre os valores das absorções obtidas por meio do processo de deconvolução, assim como daqueles adquiridos através de testes de segunda derivadas. Além disso, ainda aponta os valores da área e da largura média de cada banda obtida pela aproximação Gaussiana. Nota-se que, após a deconvolução, alguns valores atribuídos a picos de absorção nos testes de segunda derivada sofrem pequenos desvios, como o pico de 996 cm^{-1}, que se deslocou de 1 cm^{-1}.

Ao se procurar por marcadores biológicos, os dados contidos na parte do espectro mostrado na figura 5.9 podem revelar pistas e possibilidades importantes. Quando se pensa em caracterização de moléculas biológicas complexas, o valor em torno de 1085 cm^{-1} é atribuído a estiramentos simétricos do tipo PO_2^- da estrutura do DNA ("Backbone"); já os valores de aproximadamente 1065, 1053, 1029, 1013, 997, 986 e 975 cm^{-1} podem ser associados a desoxirribose (DNA na conformação Z), a estiramentos de ligações do tipo fosfodiéster, a estiramentos do tipo C-O de ribose, a estiramentos do tipo C-O de desoxirribose, a estiramentos C-O de desoxirribose e C-C, ao estiramento C-C do DNA ("Backbone") e à presença de polissacarídeos respectivamente.

Ressalta-se que o exposto acima não comprova a existência de moléculas biológicas complexas na faixa espectral analisada, ou seja, somente aponta possibilidades da presença delas na atmosfera. Deve-se considerar ainda que vários outros gases e materiais diversos podem influenciar a formação do espectro observado.

A tabela 5.5 foi utilizada para auxiliar a identificação de bandas e absorções atribuídas a componentes biológicos.

Tabela 5.5 - Principais bandas encontradas em materiais biológicos (DNA, células suspensas e tecidos). Aqui, utilizou-se as seguintes convenções: ν, estiramento; δ, dobramentos; Υ, *wagging, twisting* e *rocking*; def, deformação; as, assimétrico; s, simétrico. Dados baseados em Wood (2016).

Principais bandas encontradas em amostras biológicas (DNA, células e tecidos)	
Número de onda (cm^{-1})	Atribuições
3600-3500	Amida A, proteinas, ν(N-H)
3490	Água, ν_3, ν_{as} OH
3277	Água, ν_2, ν_{as} OH
2956	ν_{as} CH_3 (cadeias de ácidos lipídicos)
2922	ν_{as} CH_2 (cadeias de ácidos lipídicos)
2874	ν_s CH_3 (cadeias de ácidos lipídicos)
2852	ν_s CH_2 (cadeias de ácidos lipídicos)
1740	Lipids, ν(C=O) (ester carbonílico)
1715	B-DNA (vibração de emparelhamento de bases) (νC=O and νC=N)
1708	A-DNA (vibração de emparelhamento de bases) (νC=O and νC=N)
1720-1666	νC=O oriundas de purinas e pirimidinas
1695	Z-DNA (vibração de emparelhamento de bases) (νC=O and νC=N)
1690	RNA, νa(C2=O)
1660-1665	DNA, ν(C5=O), δ(N=H), RNA, ν(C6=O)
1650	Amida I, proteína, $\alpha-$*helical*
1635	Amida I, proteína, $\beta-$*pleated sheet*
1642	Água, ν_2, $\delta(H_2O)$
1610	DNA and RNA, ν(C4=C5) (*imidazole*)
1605	DNA, δNH_2
1578	DNA and RNA, νC=N (*imidazole ring*)
1545-1530	Proteínas, amida II
1418, 1425, 1408	DNA, B-DNA, Z-DNA (desoxirribose)
1457	$\delta_{as}CH_3$ de proteínas celulares
1450	Proteínas, lipídeos, δCH_2
1400	νCOO_{2-} de ácidos graxos e cadeias laterais de aminoácidos
1300-1250	Proteínas, amida III
1244	RNA, $\nu_{as}PO_{2-}$
1240, 1225, 1215	DNA, B-DNA, Z-DNA, $\nu_{as}PO_{2-}$
1185	A-DNA, ribose
1160, 1120	RNA, ν(C=O) ribose
1080	DNA, $\nu_{as}PO_{2-}$
1060, 1050	DNA, RNA, ν(C-O) ribose
1038	RNA, ν(C=O) ribose
1015	DNA and RNA, ν(C-O) ribose
1014-1018	Z-DNA (*marker band*)
996	RNA, *uracil ring motions*
970, 915	DNA, RNA, *ribose-phosphate skeletal motions*
899, 894, 929	A-DNA, B-DNA, Z-DNA
806, 830-840	A-DNA, B-DNA

A análise mais detalhada das outras partes do espectro será apresentada quando necessário. A base de dados obtida por meio dos testes de primeira e segunda derivadas do espectro da atmosfera terrestre será utilizada para comparação, por meio de métodos seme-

lhantes, aos dados espectrais obtidos a partir da análise dos espectros do micro-organismo *Halobacterium salinarum*.

5.5 Caracterização espectral do micro-organismo *Halobacterium salinarum*

Espectros de amostras biológicas, contendo DNA e células suspensas do micro-organismo extremófilo *Halobacterium salinarum*, foram tomados utilizando as técnicas de FTIR, FTIR-ATR e micro-FTIR. Em um primeiro momento, o procedimento consistiu na deposição de soluções aquosas contendo o material biológico de interesse em janelas de Seleneto de Zinco (ZnSe) e a tomada dos espectros, utilizando a técnica de microespectroscopia por transmissão. A figura 5.10 mostra os espectros obtidos a partir de microfilmes.

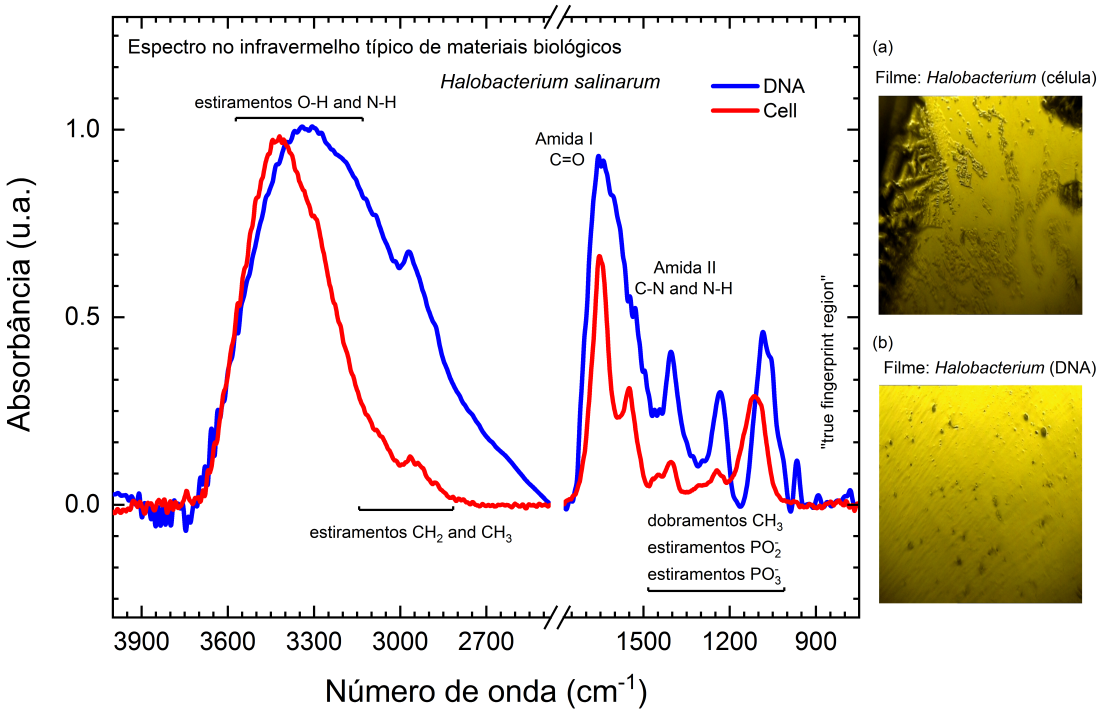

Figura 5.10: Espectro infravermelho normalizado de DNA e células suspensas da archaea *Halobacterium salinarum*. Espectros obtidos a partir de microfilmes de (a) céluas inteiras e (b) DNA purificado.

Os espectros das figuras 5.11 e 5.12 mostram as características gerais dos modos vibracionais (regiões caracterísiticas e bandas moleculares,) atribuídos às estruturas presentes na archaea. Nota-se, ainda, a região de *fingerprint* amplificada, mostrando algumas ban-

das de absorção menos intensas, mas de grande interesse na comparação com o espectro atmosférico terrestre.

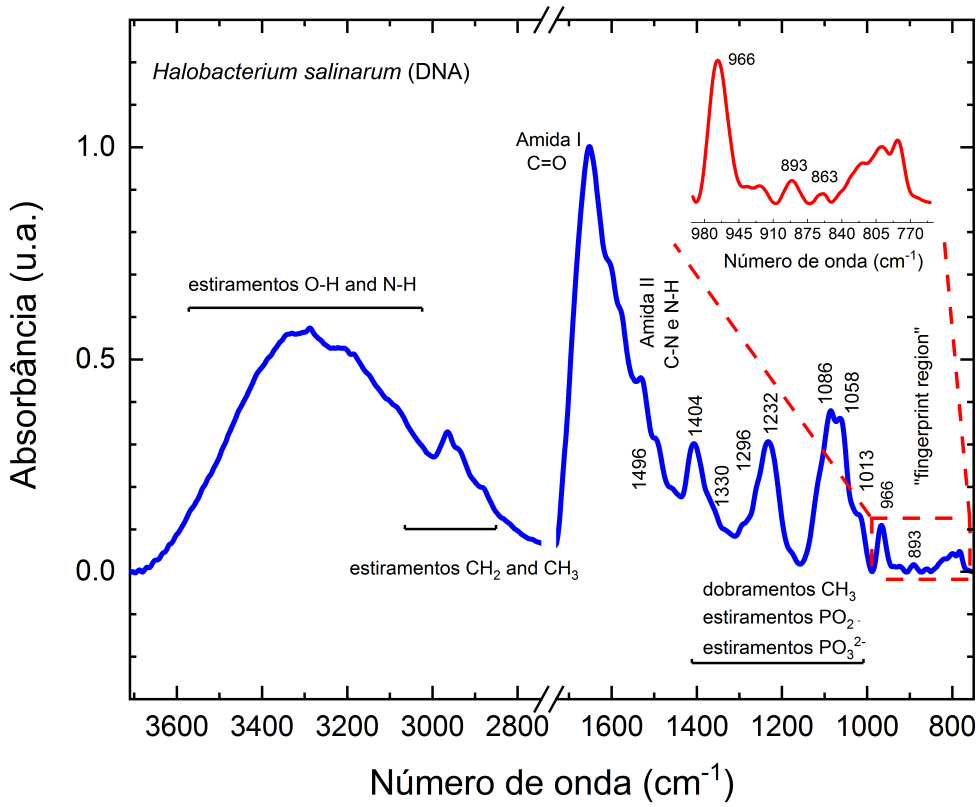

Figura 5.11: Espectro de 30 μl de solução contendo 540 $ng/\mu l$ de DNA da archaea *Halobacterium salinarum*.

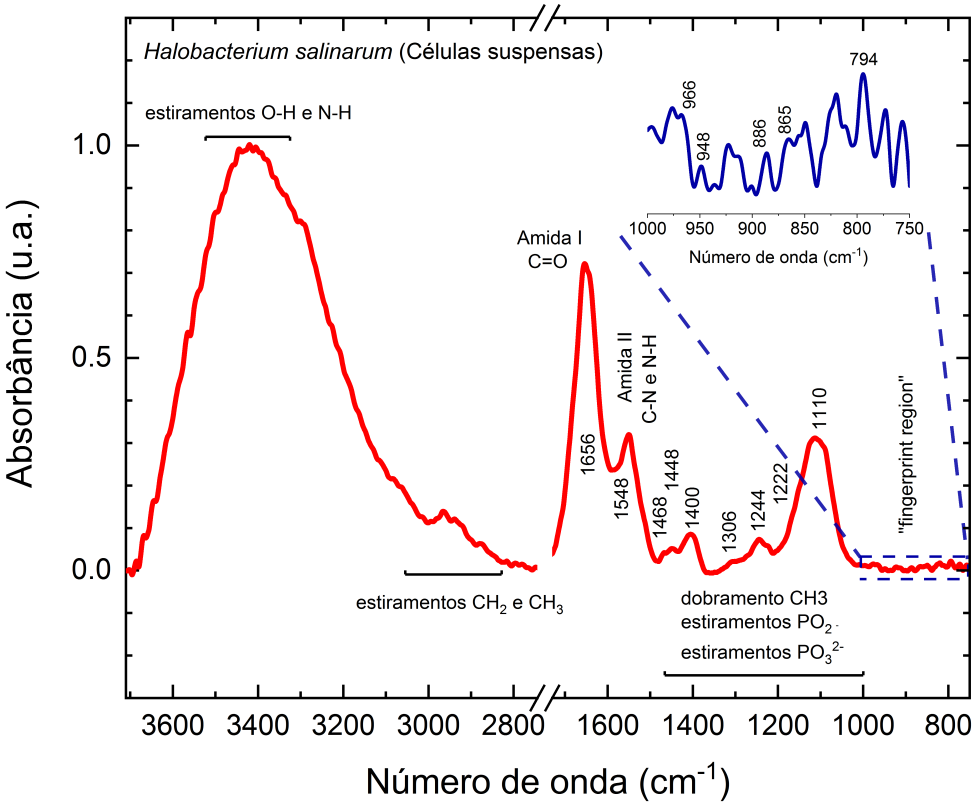

Figura 5.12: Espectro de 30 μl de solução contendo células suspensas da archaea *Halobacterium salinarum* ($D.O.600nm = 0.5$).

Observa-se que, na região compreendida entre aproximadamente 3670 e 3010 cm^{-1}, há bandas largas e intensas, oriundas de estiramentos O-H e N-H. Já na janela entre 3000 e 2890 cm^{-1} aparecem absorções relacionadas à presença de estiramentos de grupos funcionais como CH_2 e CH_3, geralmente atribuídos aos lipídeos e às proteínas. Essas regiões estão presentes em todos materiais biológicos (DNA e células suspensas) de micro-organismos, podendo apresentar pequenos deslocamentos em relação às posições mostradas nas figuras.

A região compreendida entre aproximadamente 1700 e 1500 cm^{-1} apresenta bandas intensas e características das amidas I e II (1650 e 1550 cm^{-1}); além dessas bandas, a faixa espectral se caracteriza por fornecer informações importantes sobre modos de vibração atribuídos às nucleobases, mas que são camufladas devido à presença da água. Geralmente, alguns pesquisadores utilizam soluções contendo D_2O para a caracterização dessa região, procedimento que não foi realizado, pois ambientes atmosféricos contêm água; uma alternativa é extrair o máximo de informações por meio de testes de segunda derivada.

No espectro do DNA, observa-se de forma direta alguns indícios de bandas em torno

de 1600 e 1576 cm^{-1}, que são atribuídas à presença de proteínas; porém, no espectro das células essas bandas não são observadas diretamente. Por meio de testes de segunda derivada (vide figura 5.13), encontrou-se ainda no espectro de DNA picos de absorção com valores iguais a 1694, 1664, 1654 e 1528 cm^{-1}. O primeiro valor pode ser atribuído aos modos de estiramentos da timina e citosina (C=O); os seguintes, à presença de bases nitrogenadas como a guanina, a timina, e a guanina respectivamente (Le-Tien et al., 2007; Movasaghi et al., 2008). Já a investigação do mesmo intervalo espectral para as células suspensas, revelou picos de absorção com valores de 1786, 1714, 1656, 1638 cm^{-1}, que podem ser atribuídos a vibrações de estiramento do tipo C=O, à presença de timina (C=O), de citosina (C=O) e às vibrações do tipo C=C ou N-H, oriundas de bases nitrogenadas como timina, adenina ou guanina respectivamente (Yu e Irudayaraj, 2005; Movasaghi et al., 2008).

A observação direta da janela entre 1500 e 1250 cm^{-1} do espectro do DNA, revela picos com os valores de 1496, 1404, 1330 e 1296 cm^{-1}. O primeiro valor pode ser atribuído à existência de bases nitrogenadas como a adenina e a guanina (dobramentos N7C8H e vibrações de anéis). Logo em seguida, aparece uma banda intensa com valor de pico centrado em 1404 cm^{-1} de origem correlacionada à presença de desoxirribose; já o valor de 1330 cm^{-1} pode ser atribuído ao estiramento do tipo C-N oriundo de vibrações de bases nitrogenadas como timinas e adenina, assim como o valor de 1296 cm^{-1} pode ter sua origem relacionada a deformações do tipo N-H em citosinas ou de resíduos de timina (Movasaghi et al., 2008).

A realização do mesmo procedimento para as células suspensas revela bandas de absorção com valores centrais de pico iguais a 1468, 1448, 1400, 1306 e 1244 cm^{-1}. O valor de 1468 cm^{-1} é devido à vibração de dobramento do tipo CH_2, denunciando a presença de lipídeos e proteínas, enquanto o valor de 1448 cm^{-1} é oriundo de modos assimétricos de dobramentos de grupos do tipo CH_3 presente em proteínas. O pico em 1400 cm^{-1} pode estar ligado à deformação assimétrica do grupo CH_3 ou a estiramentos simétricos do tipo COO^- de aminoácidos. A absorção observada em 1306 cm^{-1} é muito próxima aos modos de vibração da amida III e o pico em 1244 cm^{-1} tem origem atribuída às vibrações do tipo PO_2^- (Movasaghi et al., 2008).

A faixa espectral entre 1250 e 1000 cm^{-1}, quando observada diretamente, revela duas bandas largas e intensas para o espectro do DNA. Os valores de picos em torno de 1232,

1086 e 1058 cm^{-1} podem ser atribuídos a estiramentos assimétricos do tipo PO_2^-, estiramentos simétricos PO_2^- e vibrações do tipo C-O ligadas à presença da desoxirribose (Movasaghi et al., 2008). A partir da observação da mesma região no espectro das células, percebe-se picos de absorção em aproximadamente 1244, 1222 e 1110 cm^{-1}; o primeiro valor pode ser atribuído a estiramentos assimétricos do tipo PO_2^- , já o segundo, a estiramentos de grupamentos fosfatos presentes em ácidos nucleicos e, finalmente, o terceiro, a vibrações (CO e "CC ring") de polissacarídeos (Movasaghi et al., 2008).

A janela compreendida aproximadamente entre 1000 e 750 cm^{-1}, denominada *true fingerprint region* é caracterizada por superposição de bandas e considerada de difícil análise. Apesar dos espectros mostrados nas figuras 5.11 e 5.12 mostrarem alguma semelhança no intervalo entre 4000 e 1000 cm^{-1}, é justamente nessa faixa de análise mais complexa que eles diferem bastante. Algumas absorções presentes nesta região merecem atenção, particularmente no espectro do DNA, os picos em 966, 893 e 863 cm^{-1}, e no espectro das células suspensas, os picos em 886 e 794 cm^{-1}. O pico de 966 cm^{-1} é atribuído ao estiramento C-C do DNA ("backbone"), enquanto as absorções em torno do valor de 893 cm^{-1}, do tipo C-O e C-C, têm suas origens relacionadas à presença de desoxirriboses, assim como o valor de 863 cm^{-1} provavelmente esteja relacionado à presença de açúcares ("N-type"). A absorção em 886 cm^{-1} pode estar correlacionada à presença de desoxirriboses (C-C e C-O) e o pico localizado em 794 cm^{-1} à presença de guanina em conformações do tipo Z-DNA (Taillandier e Liquier, 2006; Movasaghi et al., 2008).

Todos os outros valores de bandas de absorção imperceptíveis de forma direta foram obtidos por meio de testes de segunda derivada. A figura 5.13 mostra os espectros de segunda derivada para as amostras contendo DNA e células suspensas. Já a tabela 5.6 resume todos os valores das absorções obtidas a partir do espectro atmosférico terrestre e dos espectros do micro-organismo *Halobacterium salinarum*.

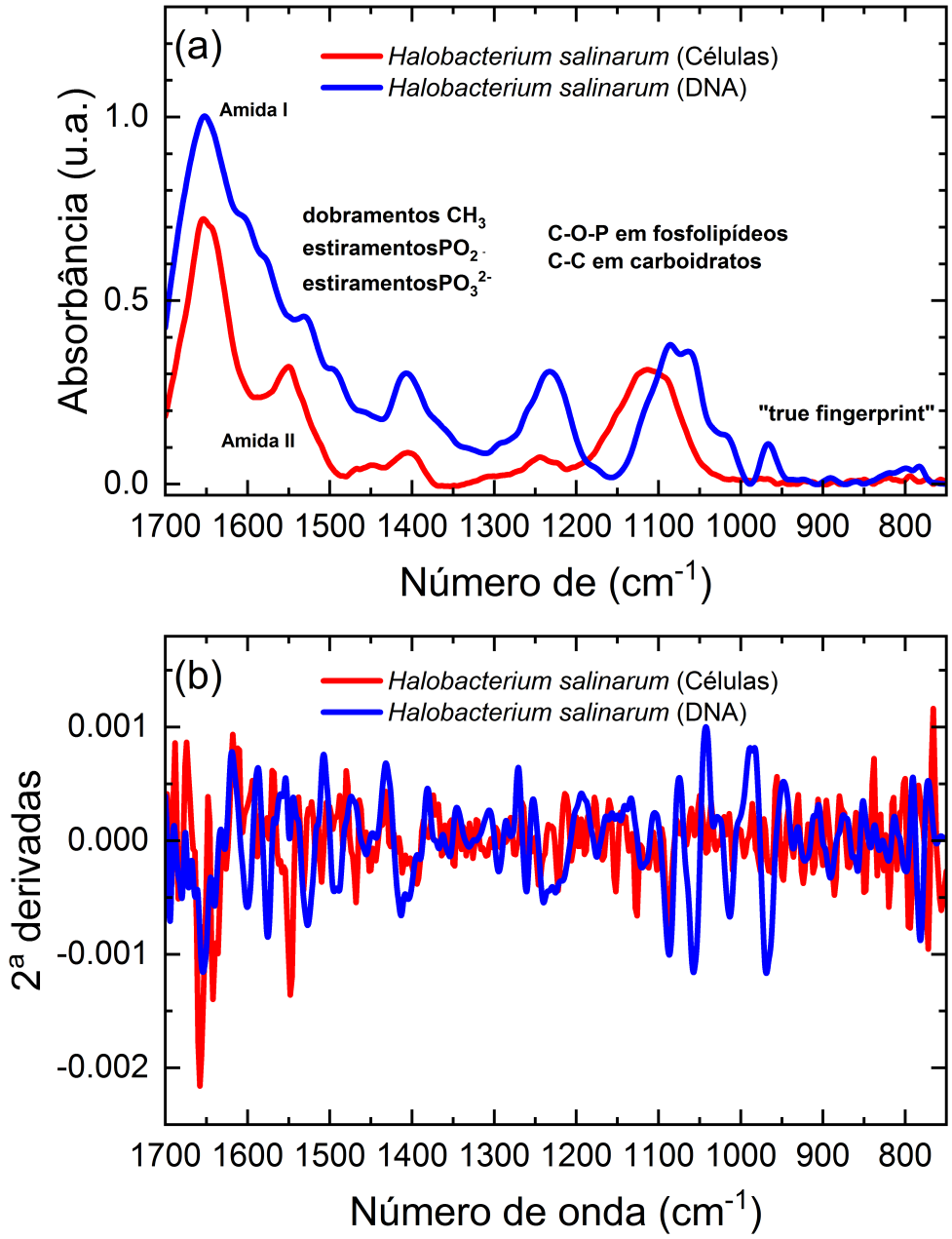

Figura 5.13: Comparação entre os espectros de células suspensas e DNA da archaea *Halobacterium salinarum*. (a) Espectro infravermelho, mostrando as absorções dos principais grupos funcionais moleculares presentes nas amostras. (b) Teste de segunda derivada de cada espectro. Várias bandas podem ser identificadas por meio deste método.

Tabela 5.6 - Valores de absorção obtidos a partir dos espectros do DNA, de células suspensas e da atmosfera.

Halobacterium salinarum versus atmosfera terrestre			Região Específica
Célula (cm^{-1})	DNA (cm^{-1})	Atmosfera (cm^{-1})	
	1176	1174	Vibrações devido a cadeias de açúcar-fosfato
1168		1166	
	1160	1162	
1152	1152	1153	
1144	1146		
1136	1138	1140	
1126		1129	
1112	1114	1114	
1102		1104	
1088	1086	1084	
1074		1070	
1066	1066		
1056	1057	1053	
1042		1044	
1030	1034	1034	
1026	1026	1027	
1018		1018	
1010	1012	1013	
996		996	Vibrações devido a cadeias de açúcar/açúcar-fosfato
982	986	986	
976		975	
966	966	966	
948		944	
936	936	938	
		932	
924	924	924	
	915	918	
912		910	
	908	906	
900	900		
	893		
		888	
886		885	
878	880	879	
		871	
868	872	868	
	864	862	
850	858	851	
	842	845	
834	832	831	
826		825	
820	820	822	
810		814	
806	808		
794	798		

De posse destes dados é possível obter alguma informação sobre a possível presença de material orgânico na atmosfera terrestre.

5.6 Comparação do espectro atmosférico com o espectro do micro-organismo Halobacterium salinarum

A comparação do espectro atmosférico terrestre com os espectros de células suspensas e do DNA da archaea *Halobacterium salinarum* são mostrados na figura 5.14.

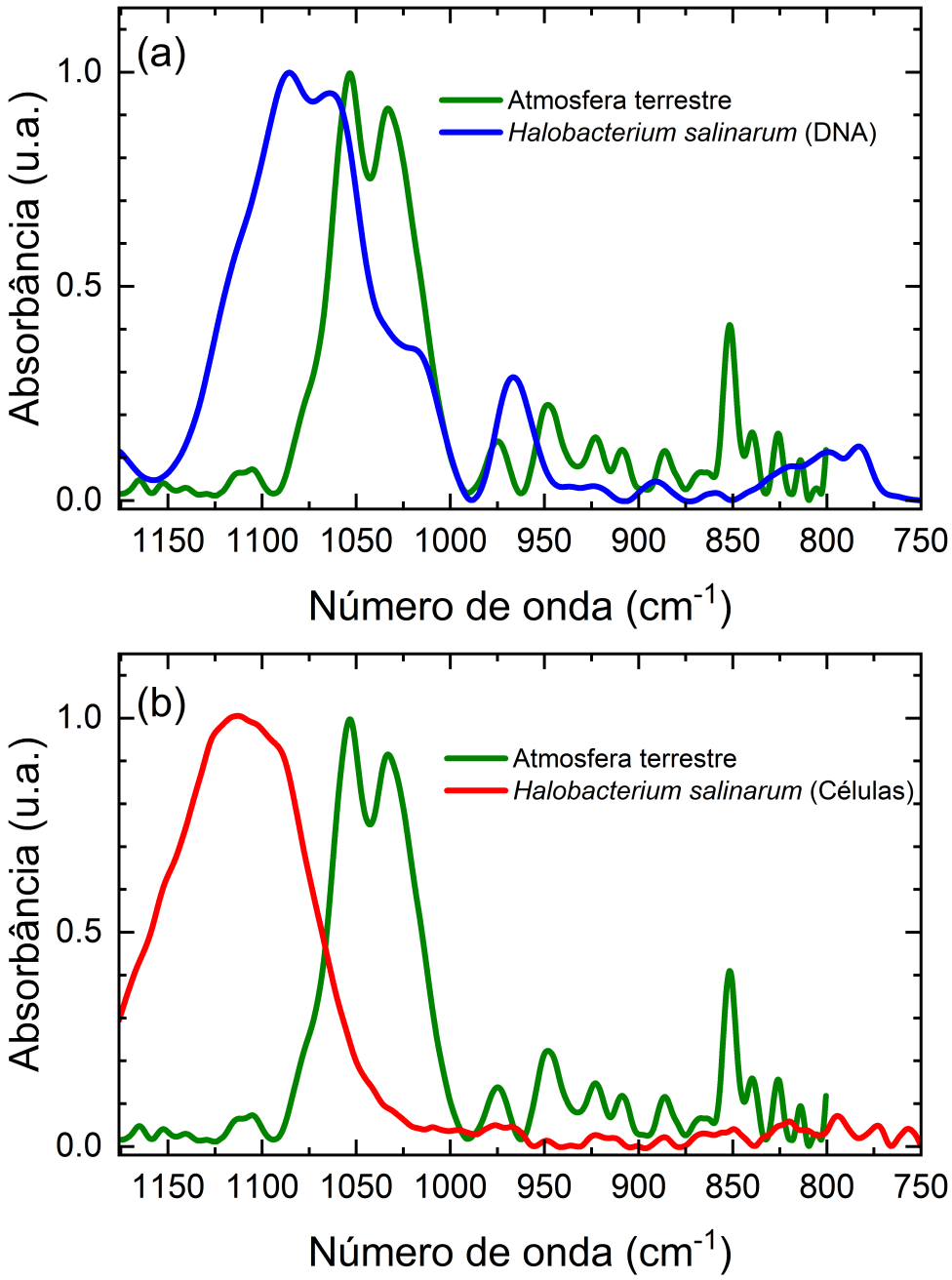

Figura 5.14: Espectro da atmosfera terrestre versus o espectro de material biológico oriundo da archaea *Halobacterium salinarum*. (a) Atmosfera versus DNA; (b) Atmosfera versus células suspensas.

A observação direta revela alguma similaridade entre o espectro das células suspensas da archaea e o espectro do céu. Há também algumas regiões onde o espectro do DNA do micro-organismo parece coincidir com o espectro da atmosfera, porém, a concordância maior é com as células. A figura 5.15 mostra a região de "fingerprint", onde se compara o espectro das células suspensas contra o espectro atmosférico, assim como os espectros de segunda derivada.

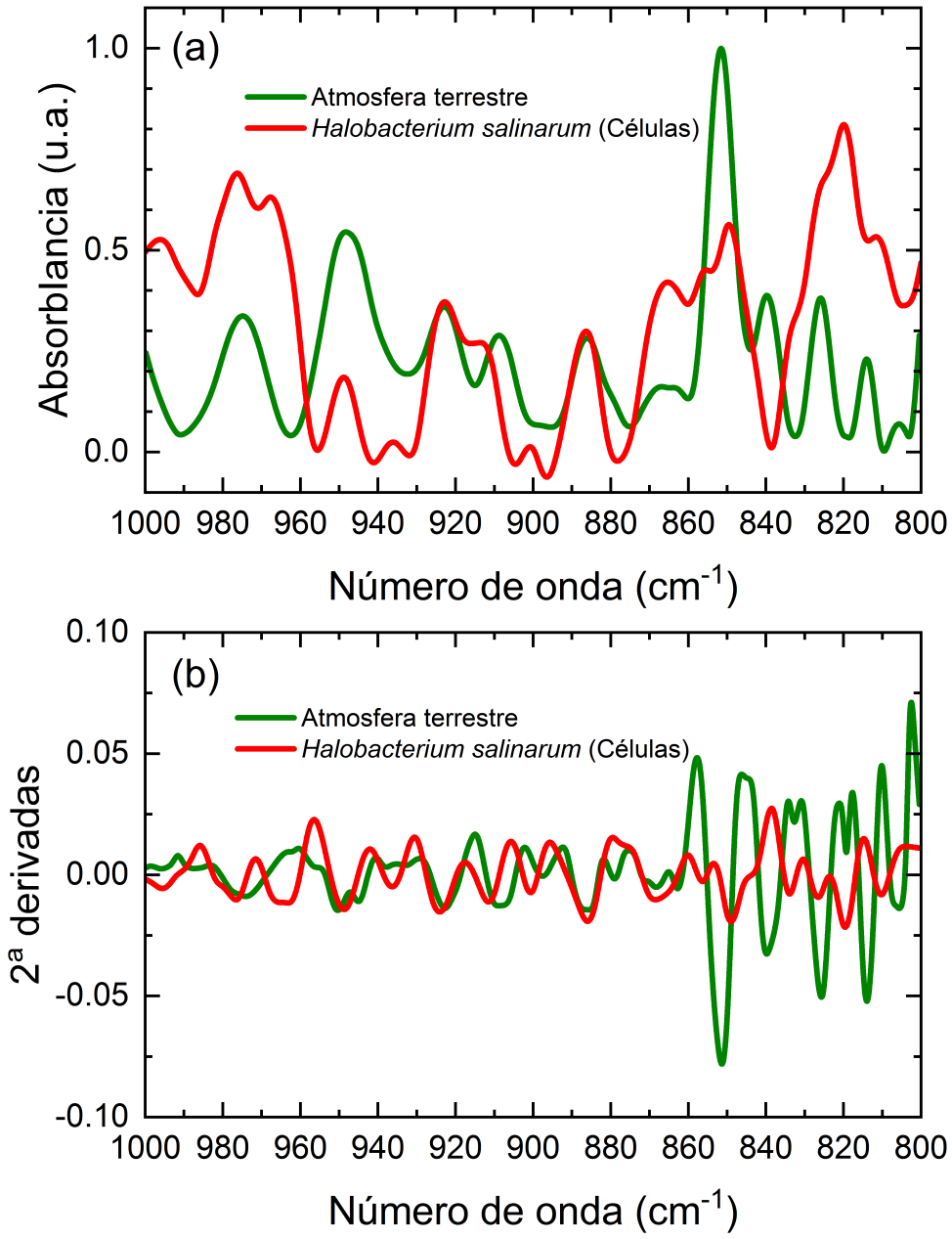

Figura 5.15: Região de *fingerprint*. (a) Semelhanças entre o espectro da archaea e do céu. (b) Teste de segunda derivada identificando os picos de absorção semelhantes.

Observa-se diretamente várias bandas de absorção semelhantes em aproximadamente:

976, 948, 924, 886, 866, 850, 826 e 812 cm^{-1}. Os dados obtidos por meio do teste de segunda deriva de toda a faixa espectral comum entre os espectros da archaea e do conteúdo atmosférico foram cruzados. Então, foi possível obter um diagrama que mostra de maneira mais objetiva a relação entre os picos de absorção analisados. A figura 5.16 representa a síntese deste estudo.

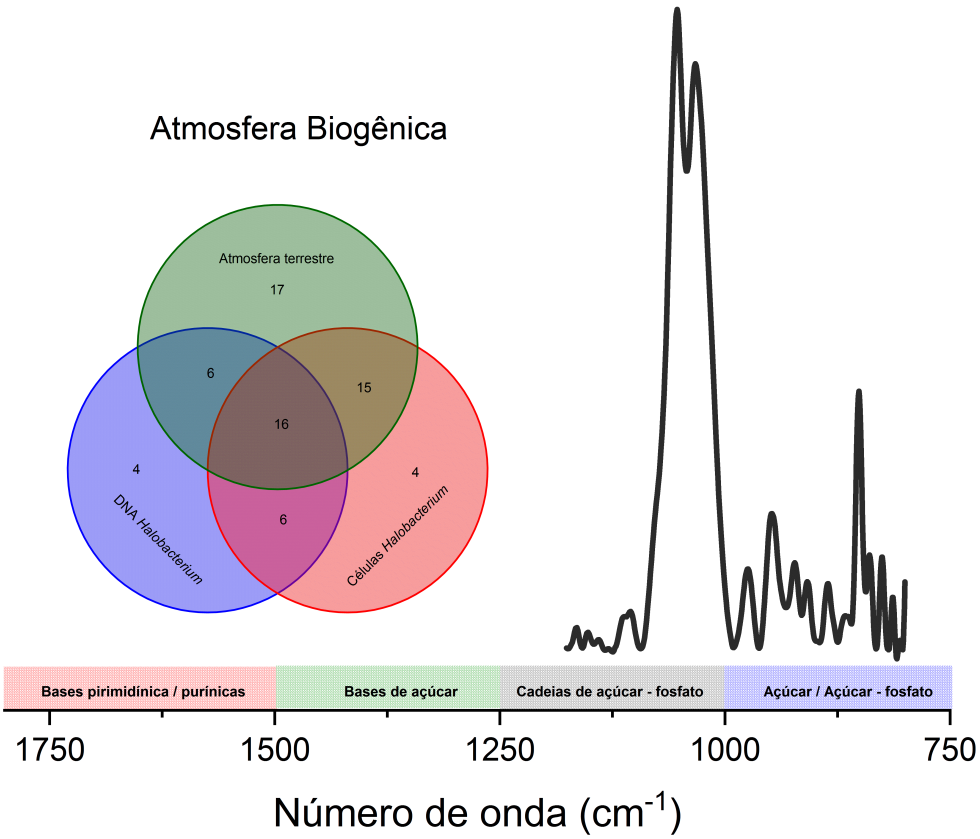

Figura 5.16: Diagrama de Venn comparando a faixa dos três espectros estudados, assim como a sua correlação com os modos vibracionais de moléculas biológicas.

A região de maior similaridade entre os dois conteúdos espectrais é vista na faixa que vai de aproximadamente 1000 a 750 cm^{-1}, uma região com várias superposições de bandas e de difícil análise. Biologicamente, ela se caracteriza por modos de vibração de intensidades fracas, oriundos principalmente devido à presença de açúcares e fosfatos.

Estudos recentes selecionaram alguns gases presentes na atmosfera terrestre que podem ser utilizados na busca de vida em um planeta habitável (Catling et al., 2018). Alguns deles e suas transições são mostradas na tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Principais bandas atmosférica no infravermelho atribuídas a gases atmosféricos e a água. Fonte: Catling et al., 2018.

Absorções dos principais gases atmosféricos e da água (cm^{-1})										
O_2	O_3	H_2O	CH_4	H_2S	SO_2	H_2SO_4	C_2H_6	CO	CO_2	N_2-N_2
1563	700	1613	1299	1429	1136	901	826	2141	2326	2326
	1042		1538	2632	1351	1064	2941		2083	
	1124				2500	1190	2967			
	1408					3125	2950			
	1724						2899			

Existem 37 bandas comuns entre os espectros do céu e do material biológico da archaea *Halobacterium salinarum* (vide intersecções no diagrama de Venn). No entanto, quatro delas devem ser excluídas, já que coincidem com as bandas atmosféricas de gases como o O_3 (em 1042 e 1124 cm^{-1}), SO_2 (em 1136 cm^{-1}) e C_2H_6 (em 826 cm^{-1}) (Catling et al., 2018). Percebe-se que três bandas oriundas de materiais biológicos podem ser mascaradas por gases atmosféricos (vide números destacados em vermelho na tabela 5.6): 1137 cm^{-1} (próxima a 1136 cm^{-1} oriunda do SO_2), 1042 cm^{-1} (próxima a 1043 cm^{-1} oriunda do O_3) e 826 cm^{-1} (próxima a 825 cm^{-1} oriunda do C_2H_6). Desse modo, essas bandas biogênicas podem não ser identificadas adequadamente quando observadas remotamente em atmosferas de exoplanetas semelhantes a Terra.

Uma observação importante foi realizada em relação à identificação do conjunto de transições de impressões digitais listadas na tabela 5.6, pertencentes à região do diagrama Diagrama de Venn onde se constata intersecções entre o material biológico preparado em laboratório e os constituites atmosféricos: a existência de bandas potencialmente detectáveis em uma atmosfera biogênica está conectada com a possível presença de grupos fosfatos ou movimentos de estruturas complexas em DNA e RNA. Os dados extraídos da tabela 5.6 foram identificados de acordo com as bases de dados de infravermelho encontrados na literatura. As absorções biologicamente significativas que não podem, em princípio, ser mascaradas por compostos atmosféricos não biogênicos são mostradas na tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Possíveis atribuições a bandas encontradas nos espectros de materiais biológicos, assim como no espectro da atmosfera terrestre. Destacam-se as transições envolvendo grupos fosfato e que denunciem a presença de ácidos nucleicos.

Principais atribuições para bandas da atmosfera e de material biológico (cm^{-1})			
Atribuição	Atmosfera	DNA purificado	Célula suspensa
Estiramento assimétrico PO_{2-} no DNA (1080)	1084	1086	1088
Z-DNA marker band (1018 - 1014)	1018		1018
RNA uracila whole ring motions (996)	996		996
DNA Ribose – PO_{2-} skeleton motions (915)	966	966	966
RNA Ribose-fosfato Skeleton motions (915)	918	915	912
A e B DNA motions (899-894)	888	900	900
		893	
B-DNA motions (840-830)	840	842	834
	831	832	

A existência de uma quantidade significativa de modos vibracionais coincidentes, sugere que a archaea esteja presente na atmosfera terrestre.

5.7 Determinação de bandas de calibração

Na busca de se encontrar uma banda para ser utilizada como um fator de calibração em futuros estudos, um experimento foi preparado com o objetivo de observar um gradiente de concentrações. Assim, amostras contendo 760, 76, 7.6, 0.76, e 0.076 $ng/\mu l$ de DNA do micro-organismo *Halobacterium salinarum* foram submetidas a análises espectroscópicas por meio da técnica de FTIR-ATR. O procedimento consistiu na deposição de DNA purificado da archaea em folhas de cobre e, em seguida, na submissão da amostra à análise espectroscópica. A figura 5.17 mostra o resultado desta ação experimental.

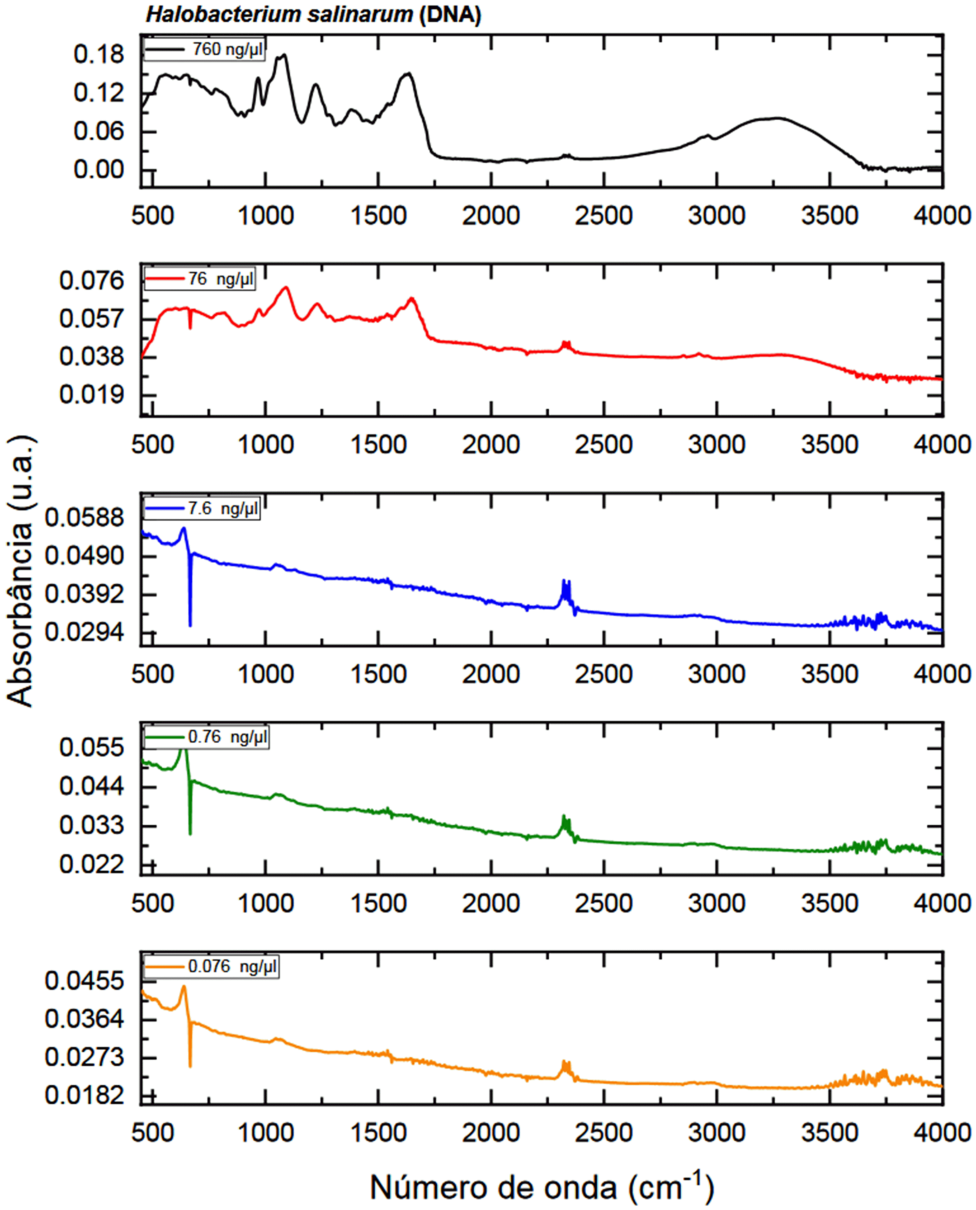

Figura 5.17: Gradiente de concentração de DNA purificado do micro-organismo *Halobacterium salinarum* por meio da técnica de FTIR-ATR.

Uma das questões a serem entendidas correspondia à necessidade de testar o caráter espectral da amostra, ou seja, se a informação biológica era perdida em consequência de se observar concentrações muito baixas como, por exemplo, variações na faixa de 760 a 0.0076 $ng/\mu l$ (5 ordens de magnitude). A resposta é que apesar da degradação de algumas bandas de absorção ainda há possibilidades de se identificar a archaea.

Apesar da evidente queda de sinal a partir de concentrações próximas a 7.6 $ng/\mu l$ é possível aplicar alguns testes que utilizam manipulações matemáticas para evidenciar a

proximidade espectral entre as amostras. Desse modo, concluiu-se que todas as amostras apresentam algumas características em comum. Os testes escolhidos foram: Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise por *Cluster*. As figuras 5.18 e 5.19 mostram os resultados destas análises.

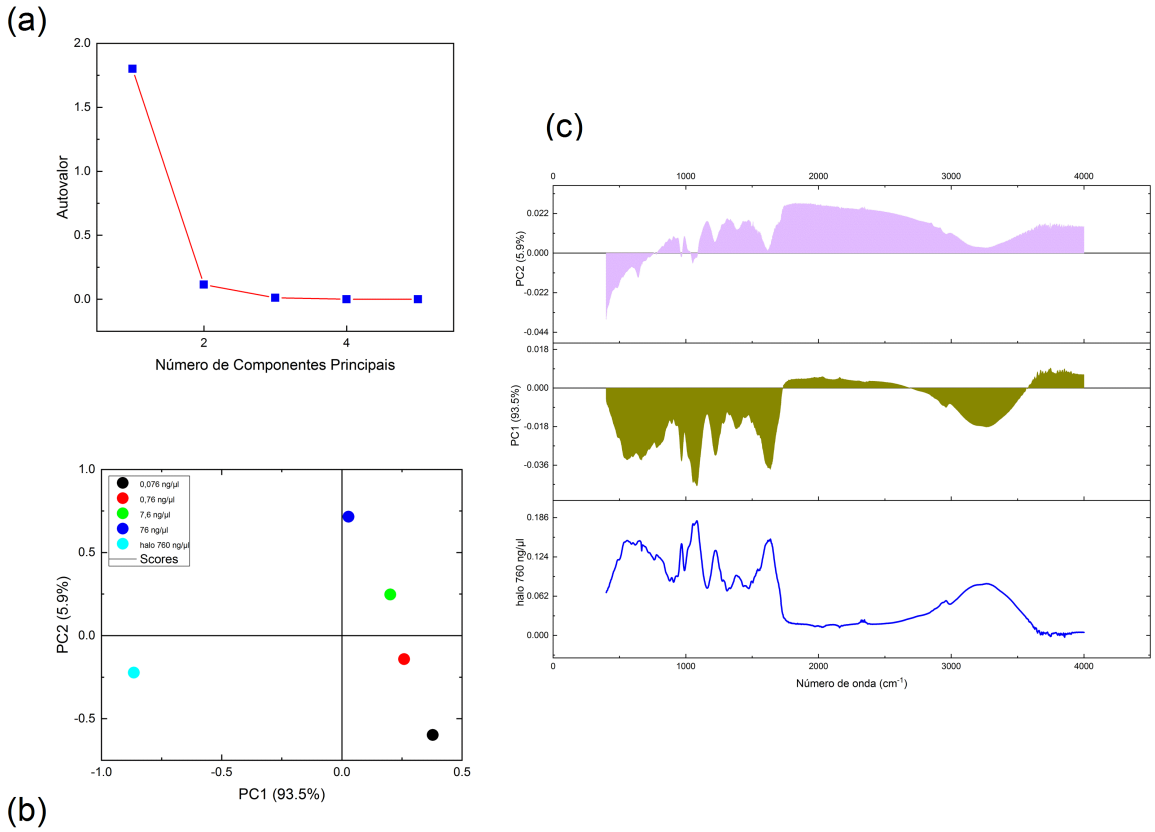

Figura 5.18: Análise de Componentes Principais para o gradiente das amostras, contendo DNA purificado da archaea *Halobacterium salinarum*. Em (a) é mostrado que somente duas componentes são necessárias para explicar a variabilidade dos dados (PC1 e PC2); em (b) a formação de grupos distintos. Finalmente em (c), apontam-se quais são os principais picos que caracterizam PC1 e PC2 quando escolhemos como referência o espectro mais concentrado.

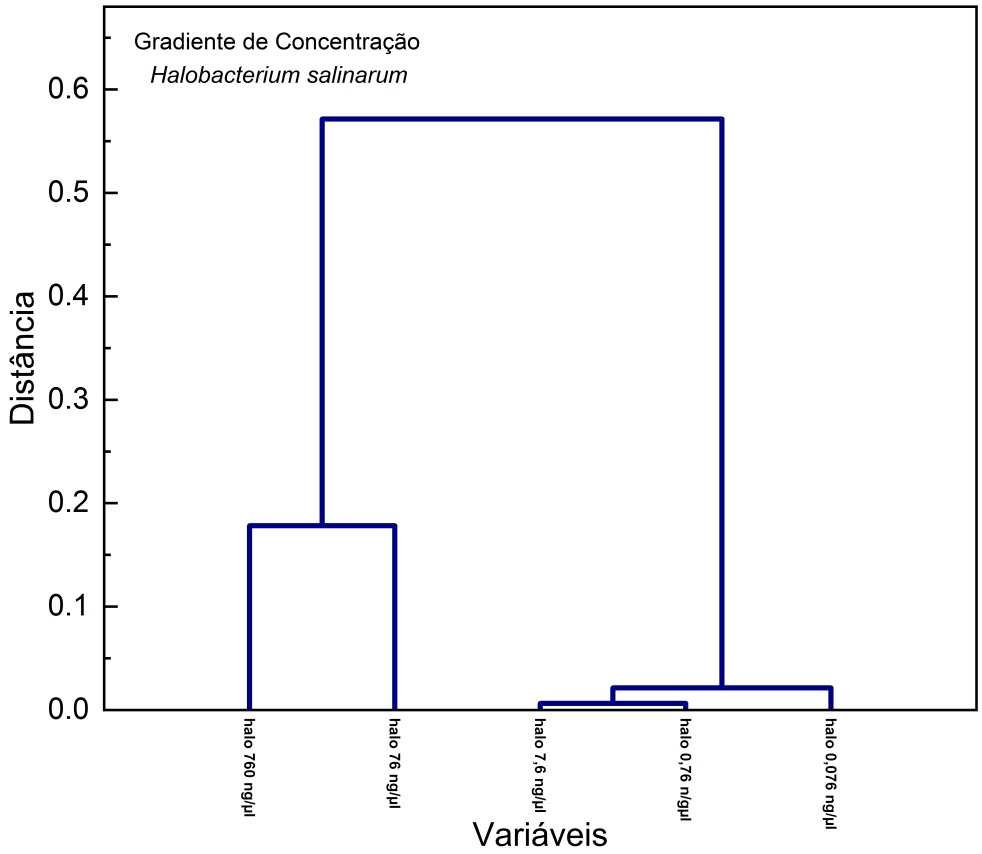

Figura 5.19: Aplicação da técnica matemática de Análise por *Cluster* para os espectros da *Halobacterium salinarum*.

Observa-se a formação de grupos distintos, porém, que apresentam similaridades correlacionadas com a quantidade de material biológico presente na amostra. Vale ressaltar que essa análise pode ser empregada em cada faixa espectral de interesse do espectro no infravermelho, sendo muito útil para caracterizar as regiões de *fingerprint* (região de análise complexa).

Ainda com base na análise do gradiente das amostras do micro-organismo *Halobacterium salinarum*, foi possível a construção de um gráfico de absorbância versus concentração e uma consequente regressão linear (vide figura 5.21). O objetivo é encontrar uma relação entre quantidade de material biológico e a intensidade da absorção, assim como a determinação de uma banda que possa ser usada como um marcador em uma futura calibração. Com essa finalidade, um espectro foi obtido (vide figura 5.20) utilizando-se a amostra contendo a maior concentração de DNA purificado (760 $ng/\mu l$) e dentre as bandas de absorção encontradas, algumas foram analisadas: 1221, 966 e 893 cm^{-1}.

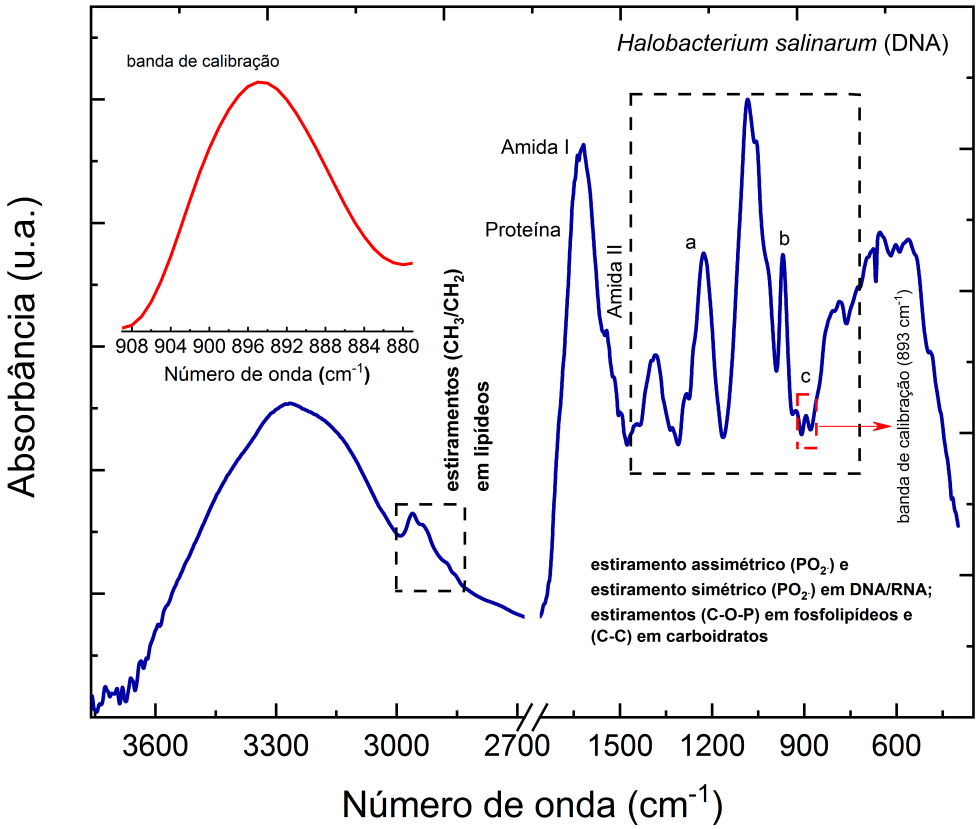

Figura 5.20: Espectro de DNA purificado da *Halobacterium salinarum* mostrando as possíveis candidatas a bandas de calibração.

Observa-se que a banda em 1221 cm^{-1} é acompanhada de um pequeno ombro indicando a interferência do meio. A banda de 966 cm^{-1} apresenta um contorno bem definido, no entanto encontra-se superposta com uma banda muito intensa e larga na região de 1100 cm^{-1}. A banda em 893 cm^{-1} apresenta intensidade muito pequena, mas um contorno bem definido e simétrico.

Além da análise visual, uma curva padrão foi construída para verificar se com o aumento da concentração da amostra há um aumento proporcional da intensidade das bandas marcadoras. Os espectros foram pré-processados com softwares *Spectrum* 5.3 (*PerkinElmer*) e com *ORIGIN* 9.0. Foram realizadas as correções de linha de base, suavização espectral utilizando algoritmo *Savistzky Golay* (9 pontos) e normalização. Calculou-se, posteriormente, as intensidades integradas ou áreas das bandas de 1221, 966 e 893 cm^{-1}. Os resultados mostram um aumento proporcional da intensidade integrada da banda de 893 cm^{-1} com a variação da quantidade de amostra. A banda de 1221 cm^{-1}, assim como a de 966 cm^{-1} não demonstraram esta proporcionalidade quando submetidas ao mesmo

tratamento. A tabela 5.9 resume os resultados obtidos para a banda de 893 cm^{-1}.

Tabela 5.9 - Valores de intensidade versus valores de concentração para as diversas amostras do micro-organismo *Halobacterium salinarum*. Os dados referem-se à banda marcadora de 893 cm^{-1}.

Análise de banda marcadora – *Halobacterium salinarum* (DNA)	
Sample ($ng/\mu l$)	I893
760	13.9991
76	11.6276
7.6	9.2219
0.76	5.7463
0.076	3.3045

A figura 5.21 apresenta a curva de calibração para os dados apresentados na tabela 5.9. O coeficiente de correlação obtido foi de $R = 0.9988$ e a equação de ajuste obtida é igual a $y = 2.7278x + 6.3783$, com desvio padrão de ajuste igual a 0.34704. Foram considerados os valores em logaritmo por se tratar de intervalo de análise muito extenso (0.076 a 760 $ng/\mu l$). O valor de $R = 0.9988$ mostra forte correlação entre o modo vibracional da banda em 893 cm^{-1} e a quantidade da amostra presente, o que justifica sua utilização como banda marcadora, podendo ser usada para a construção de uma curva de calibração.

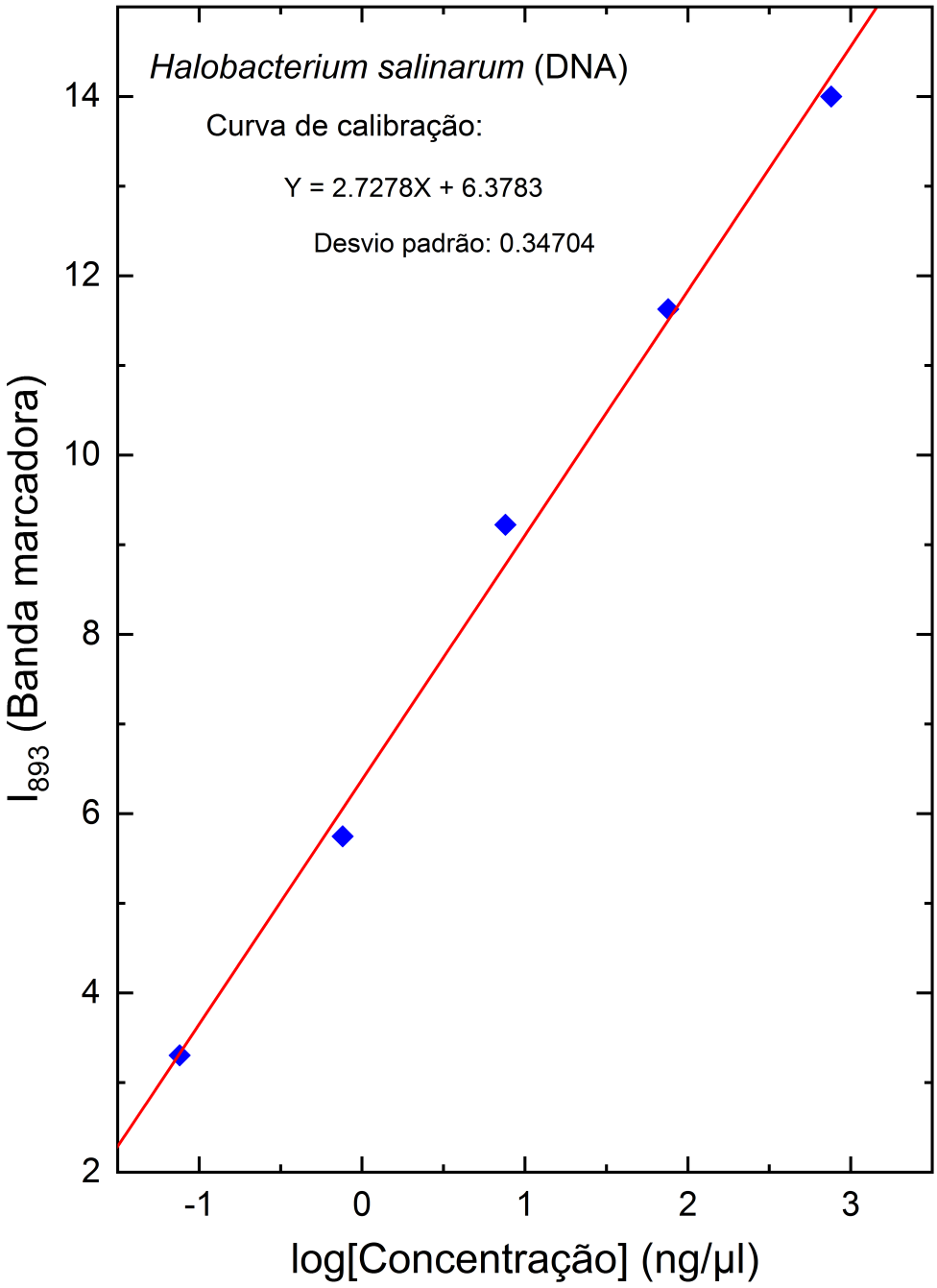

Figura 5.21: Regressão linear para a banda de 893 cm^{-1} presente no espectro da archaea *Halobacterium salinarum*.

A banda em 893 cm^{-1} é oriunda de vibrações da ligação do tipo C-C e C-O de desoxirribose (DNA) e pode servir como base para futuras calibrações (destaque em azul na tabela 5.6).

5.8 Exposição de objetivos e procedimentos experimentais secundários

No projeto original havia a possibilidade de instalação de um dispositivo de coleta de material biológico em um balão que seria lançado pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), dentro do planejamento do experimento *ProtoMirax*. Infelizmente, a ideia se tornou inviável, o que estimulou a busca de colaborações para a construção de uma sonda de coleta, assim como de auxílio para seu lançamento. Nesse contexto, uma parceria entre o grupo de pesquisa em Astrobiologia do departamento de Astronomia da Universidade de São Paulo e o Instituto de Tecnologia Mauá surgiu. O objetivo foi o de coletar material orgânico presente na atmosfera e, posteriormente, em laboratório (por meio de técnicas como espectroscopia, inoculação em meio de cultura, análise por PCR, etc.), quantificar e identificar micro-organismos, biomoléculas, vírus, carotenóides, pigmentos, etc., presentes nas amostras adquiridas durante o voo.

Parte do trabalho da construção da sonda foi realizada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Dentre eles, testes de esterilização de filtros de coleta e exposição a baixa temperatura, além da construção e esterilização de peças a serem embarcadas (vide figura 5.22).

Figura 5.22: Aponta-se aqui, os trabalhos realizados na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que tinham como objetivo construir, testar e garantir certos parâmetros mínimos dos materiais específicos embarcados na sonda (peças e filtros). Em (a) aponta-se peças construídas para proteger os filtros. Já em (b) destaca-se o processo de esterilização de algumas peças embarcadas na sonda. Em (c) aponta-se o processo de esterilização dos filtros. Em (d) os testes mecânicos em baixas temperaturas.

Observou-se que os filtros da marca *Sartorius*, que serão utilizados para a coleta de material biológico na atmosfera são aparentemente construídos em linhas de produção limpa, pois somente um dentre os três analisados apresentou contaminação (o mesmo não foi observado para outras marcas). Os procedimentos de irradiação com UV germicida ou a esterilização padrão conforme a literatura pertinente, resultaram satisfatórios para tal fim, pois não houve qualquer crescimento de contaminantes após uma semana sob incubação em meio nutriente. Concluiu-se, também, que o procedimento plausível de esterilização dos suportes que abrigarão os filtros é similar ao utilizado na descontaminação de material hospitalar: imersão em hipoclorito de sódio 30% *overnight* a frio, seguido de lavagem em etanol 70% "overnight" a frio, exposição a UV por 30 *min* e secagem em fluxo laminar limpo.

A parte mecânica do experimento foi planejada e construída no Núcleo de Sistemas

Eletrônicos Embarcados (NSEE), do Instituto Mauá de Tecnologia (São Caetano do Sul, SP). A sonda foi montada e lançada em novembro de 2018 (vide figura 5.23). A carga embarcada foi resgatada e os filtros contendo material biológico provenientes da atmosfera, coletados e transportados até os laboratórios especializados em análise microbiológica. Os dados oriundos do voo servirão de base para novas pesquisas que visam compreender a presença de material biológico na atmosfera terrestre. O Apêndice B mostra a ideia e a estrutura experimental do projeto.

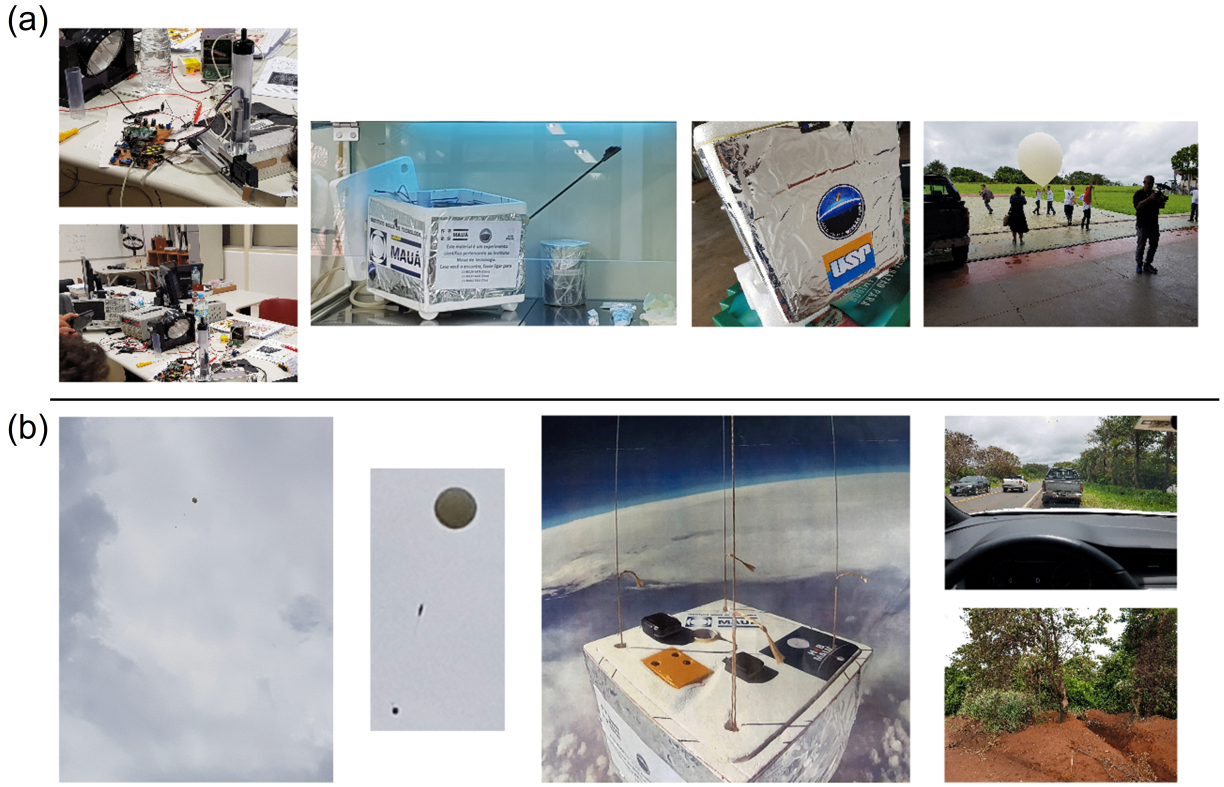

Figura 5.23: Voo da sonda suborbital. Destaca-se o processo de montagem da estrutura, o voo e recuperação da carga embarcada. Em (a) é mostrado a montagem, o processo de esterilização e a preparação para o voo. Já em (b) mostra-se o voo, seu acompanhamento e a recuperação da carga.

Capítulo 6

Conclusão

O objetivo principal desta pesquisa está vinculado ao estudo da atmosfera terrestre e sua interação com a biosfera. A ideia central consiste em entender como moléculas biológicas complexas, que estão mergulhadas em um ambiente gasoso, dão origem a sinais que possam ser detectados remotamente e interpretados como oriundos de um planeta habitável.

A estrutura para a implementação do projeto contou com a criação e utilização de protocolos laboratoriais para o estudo de moléculas complexas como o DNA e células suspensas, além da observação da atmosfera terrestre. Análises espectroscópicas foram obtidas pela deposição de soluções, contendo material biológico de interesse em pastilhas de Seleneto de Zinco ou em folhas de Cobre, gerando microfilmes aptos a fornecerem bons espectros de absorbância. Cerca de 30 km do envelope de gás da Terra foi observado com a finalidade de gerar um espectro capaz de ser comparado com os espectros obtidos em laboratório.

O micro-organismo Halobacterium salinarum foi escolhido para constituir as amostras do modelo biogênico estudado. A escolha é justificada já que a archaea é um extremófilo detectado na atmosfera do planeta. Além desse argumento, destaca-se também o fato de que esse tipo de organismo pode se encapsular em estruturas salinas (halites) e ser ejetado do solo em direção à atmosfera.

Várias bandas de absorção, cobrindo a faixa espectral do infravermelho, foram identificadas, o que gerou um banco de dados com as principais características dos modos de vibração de moléculas de DNA e células suspensas (vibrações devido a cadeias de açúcar e açúcar-fosfato). O mesmo procedimento foi feito com os dados atmosféricos, o que deu origem a um conjunto de absorções características dos gases presentes na atmosfera (por

exemplo, O_3, SO_2, C_2H_6).

Após o levantamento dos espectros de laboratório terem sido produzidos e tratados matematicamente, eles foram comparados com o espectro real da atmosfera terrestre. O interesse foi o de investigar se as principais bandas de absorção atribuídas ao material biológico da archaea coincidia com as principais absorções oriundas de gases comumente encontrados no conteúdo gasoso do planeta. Concluiu-se que 37 bandas de absorção coincidem, demonstrando que a atmosfera da Terra está contaminada com moléculas biológicas complexas.

Dentre essas bandas de interseção (vide diagrama de Venn), algumas podem ser descartadas, pois coincidem com bandas de gases atmosféricos presentes na atmosfera (1042, 1124, 1136 e 826 cm^{-1}, correspondendo aos gases O_3, SO_2 e C_2H_6). Percebe-se, também, que alguns sinais biológicos podem ser mascarados por gases: a banda de 1137 cm^{-1} (próxima a 1136 cm^{-1} do SO_2), 1042 cm^{-1} (próxima a aproximadamente 1043 cm^{-1} do O_3) e 826 cm^{-1} (próxima a 825 cm^{-1} do C_2H_6). Assim, essas bandas biogênicas dificilmente serão identificadas na atmosfera de exoplanetas habitáveis.

Outro fator importante está associado ao limite mínimo de material biológico capaz de ser detectado remotamente. Para essa análise, idealizou-se um experimento onde amostras de DNA variando em 5 ordens (concentrações variando entre 760 a 0.076 $ng/\mu l$) de magnitude foram analisadas. O objetivo foi o de verificar se há características biológicas preservadas em quantidades tão baixas de material biológico. A conclusão é que há possibilidade de identificação de bandas que denunciam o caráter biogênico do sinal. A banda de 893 cm^{-1} varia linearmente com a alteração do conteúdo biológico das amostras, mostrando ser apta a ser utilizada como uma banda de calibração.

Ainda dentro do proposto pela pesquisa, foi montada uma sonda suborbital para investigar as camadas da atmosfera terrestre. Nesta etapa, trabalhou-se em colaboração com outros institutos e protocolos de esterilização de filtros e peças foram escritos, assim como a construção de peças e testes mecânicos a baixas temperaturas foram realizados. A sonda foi lançada em novembro de 2018 e sua carga recuperada (filtros expostos à atmosfera, dados relativos à radiação UV, temperatura e pressão). Os dados relativos aos experimentos idealizados para o voo estão sendo analisados.

A abordagem "Terra como exoplaneta", focada neste estudo, foi capaz de destacar marcadores biogênicos potencialmente dispersos na atmosfera, ou seja, pertencentes a um

planeta vivo. A futura detecção de transições biomoleculares dependerá definitivamente da operação de espectrógrafos de infravermelho de alta resolução para que se possa separar as bandas que surgem de moléculas complexas do espectro atmosférico não biogênico de fundo.

Os desdobramentos dos estudos contidos neste trabalho são promissores e visam à utilização da atmosfera terrestre como fonte de dados para estudar as atmosferas de exoplanetas. Dentro dessa ideia, deve-se priorizar a caracterização de outros marcadores biológicos e, também, a análise das camadas atmosféricas por meio de sondas suborbitais e de novas observações astronômicas. Abaixo segue uma lista de possibilidades para futuras pesquisas versando sobre o tema de bioassinaturas.

1) Em uma primeira abordagem, deve-se analisar outros micro-organismos extremófilos, além de outros organismos (fungos) e moléculas biológicas (carotenóides, partes de DNA, RNA, etc).

2) Outro caminho a ser seguido é o de expor as amostras biológicas a diversas fontes de radiação e levantar seus respectivos espectros.

3) Construção de um banco de dados contendo as principais transições atribuídas a materiais biológicos.

4) O levantamento do espectro real da atmosfera terrestre em uma faixa maior do espectro eletromagnético (750 a 4000 cm^{-1}) é fundamental para a comparação dos aspectos biogênicos de seus espectros com os espectros de materiais biológicos obtidos em laboratório.

5) Construção e lançamento de novas sondas orbitais que explorem sítios biológicos distintos.

6) Comparação dos espectros reais obtidos em laboratório com espectros obtidos por meio de simulação computacional.

6) Idealização de um espectrógrafo com resolução espectral capaz de detectar sinais biológicos nas atmosferas de exoplanetas.

Os pontos destacados acima fazem parte de um esforço, que busca entender o funcionamento da biosfera terrestre, assim como os mecanismos que tornam o conteúdo gasoso do planeta uma fonte que denuncia sua habitabilidade.

Referências Bibliográficas

Abyzov S., Lipenkov V., Bobin N., Kudryashov B., Microflora of central Antarctic glacier and methods for sterile ice-core sampling for microbiological analyses, Biol. Bull. Acad. Sci. USSR, 1982, vol. 9, p. 304

Achberger A. M., Brox T. I., Skidmore M. L., Christner B. C., Expression and characterization of an ice binding protein from a bacterium isolated at a depth of 3,519 meters in the Vostok ice core, Antarctica, Frontiers in microbiology, 2011, vol. 2, p. 255

Adrian-Scotto M., Antonczak S., Bredehöft J. H., Hoffmann S. V., Meierhenrich U. J., Chiroptical properties of amino acids: a density functional theory study, Symmetry, 2010, vol. 2, p. 935

Allègre C. J., Manhès G., Göpel C., The age of the Earth, Geochim. Cosmochim. Acta, 1995, vol. 59, p. 1445

Anglada-Escudé G., Amado P. J., Barnes J., Berdinas Z. M., Butler R. P., Coleman G. A., de La Cueva I., Dreizler S., Endl M., Giesers B., et al., A terrestrial planet candidate in a temperate orbit around Proxima Centauri, Nature, 2016, vol. 536, p. 437

Arrhenius S., Worlds in the making: the evolution of the universe. Harper & brothers, 1908

Astudillo-Defru N., Forveille T., Bonfils X., Ségransan D., Bouchy F., Delfosse X., Lovis C., Mayor M., Murgas F., Pepe F., et al., The HARPS search for southern extra-solar planets-XLI. A dozen planets around the M dwarfs GJ 3138, GJ 3323, GJ 273, GJ 628, and GJ 3293, Astronomy & Astrophysics, 2017, vol. 602, p. A88

Batalha N. M., Exploring exoplanet populations with NASA's Kepler Mission, Proceedings of the National Academy of Science, 2014, vol. 111, p. 12647

Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitzenberger R., Zibuschka F., Puxbaum H., The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols, Atmospheric Research, 2002, vol. 64, p. 109

Beaty D. W., Clifford S. M., Borg L. E., Catling D. C., Craddock R. A., Marais D. J. D., Farmer J. D., Frey H. V., Haberle R. M., Mckay C. P., et al., Key science questions from the second conference on early Mars: geologic, hydrologic, and climatic evolution and the implications for life, Astrobiology, 2005, vol. 5, p. 663

Bedrossian M., Nadeau J., Serabyn E., Lindensmith C., Sources and propagation of errors in quantitative phase imaging techniques using optical interferometry. In Quantitative Phase Imaging III , vol. 10074, 2017, p. 100740E

Ben-David A., Ren H., Detection, identification, and estimation of biological aerosols and vapors with a Fourier-transform infrared spectrometer, Applied optics, 2003, vol. 42, p. 4887

Benlloch S., Acinas S., Antón J., López-López A., Luz S., Rodriguez-Valera F., Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR, Microbial ecology, 2001, vol. 41, p. 12

Bernardes L., Exoplanetas, Extremófilos e Habitabilidade, Universidade de São Paulo, 2013, Tese de Doutorado

Blanchard D. C., The ejection of drops from the sea and their enrichment with bacteria and other materials: a review, Estuaries, 1989, vol. 12, p. 127

Briot D., Arnold L., Jacquemoud S., Schneider J., Agabi K., Aristidi E., Berthier J., Bondoux E., Challita Z., Petermann D., et al., The LUCAS program: detecting vegetation and traces of life in the Earthshine, Proceedings of the International Astronomical Union, 2009, vol. 5, p. 625

Brown M., Hand K., Salts and radiation products on the surface of Europa, The Astronomical Journal, 2013, vol. 145, p. 110

Bulat S. A., Alekhina I. A., Blot M., Petit J.-R., De Angelis M., Wagenbach D., Lipenkov V. Y., Vasilyeva L. P., Wloch D. M., Raynaud D., et al., DNA signature of thermophilic bacteria from the aged accretion ice of Lake Vostok, Antarctica: implications for searching for life in extreme icy environments, International Journal of Astrobiology, 2004, vol. 3, p. 1

Burrows S., Butler T., Jöckel P., Tost H., Kerkweg A., Pöschl U., Lawrence M., Bacteria in the global atmosphere–Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems, Atmospheric Chemistry and Physics, 2009, vol. 9, p. 9281

Catling D. C., Krissansen-Totton J., Kiang N. Y., Crisp D., Robinson T. D., DasSarma S., Rushby A. J., Del Genio A., Bains W., Domagal-Goldman S., Exoplanet biosignatures: a framework for their assessment, Astrobiology, 2018, vol. 18, p. 709

Chyba C. F., Energy for microbial life on Europa, Nature, 2000, vol. 403, p. 381

Clarke J., Ajello J., Ballester G., Jaffel L. B., Connerney J., Gérard J.-C., Gladstone G., Grodent D., Pryor W., Trauger J., et al., Ultraviolet emissions from the magnetic footprints of Io, Ganymede and Europa on Jupiter, Nature, 2002, vol. 415, p. 997

Crick F., Life itself: its origin and nature., Life itself: its origin and nature., by Crick, F.. New York, NY (USA): Simon and Schuster, 192 p., 1981

Damineli A., Damineli D. S. C., Origins of life, Estudos avançados, 2007, vol. 21, p. 263

Dancer S., Shears P., Platt D., Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic, Journal of Applied Microbiology, 1997, vol. 82, p. 597

de Almeida Barbosa L. C., Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos. Ed. UFV, 2007

Dittmann J. A., Irwin J. M., Charbonneau D., Bonfils X., Astudillo-Defru N., Haywood R. D., Berta-Thompson Z. K., Newton E. R., Rodriguez J. E., Winters J. G., et al., A temperate rocky super-Earth transiting a nearby cool star, Nature, 2017, vol. 544, p. 333

Fabian H., Mantsch H. H., Schultz C. P., Sequential unfolding events in proteins monitored by 2D correlation analysis of FTIR spectra. In AIP Conference Proceedings , vol. 503, 2000, p. 95

Farquhar J., Bao H., Thiemens M., Atmospheric influence of Earth's earliest sulfur cycle, Science, 2000, vol. 289, p. 756

Fendrihan S., Legat A., Pfaffenhuemer M., Gruber C., Weidler G., Gerbl F., Stan-Lotter H., , 2006 in , Life in Extreme Environments. Springer pp 125–140

Franzmann P., Stackebrandt E., Sanderson K., Volkman J., Cameron D., Stevenson P., McMeekin T., Burton H., Halobacterium lacusprofundi sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica, Systematic and Applied Microbiology, 1988, vol. 11, p. 20

Fujii Y., Angerhausen D., Deitrick R., Domagal-Goldman S., Grenfell J. L., Hori Y., Kane S. R., Pallé E., Rauer H., Siegler N., et al., Exoplanet biosignatures: observational prospects, Astrobiology, 2018, vol. 18, p. 739

Fulton J. D., Mitchell R. B., Microorganisms of the upper atmosphere II. Microorganisms in two types of air masses at 690 meters over a city, Applied microbiology, 1966, vol. 14, p. 232

Gillon M., Triaud A. H., Demory B.-O., Jehin E., Agol E., Deck K. M., Lederer S. M., De Wit J., Burdanov A., Ingalls J. G., et al., Seven temperate terrestrial planets around the nearby ultracool dwarf star TRAPPIST-1, Nature, 2017, vol. 542, p. 456

Goh F., Leuko S., Allen M. A., Bowman J. P., Kamekura M., Neilan B. A., Burns B. P., Halococcus hamelinensis sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from stromatolites in Shark Bay, Australia, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, vol. 56, p. 1323

Gramain A., Díaz G. C., Demergasso C., Lowenstein T. K., McGenity T. J., Archaeal diversity along a subterranean salt core from the Salar Grande (Chile), Environmental Microbiology, 2011, vol. 13, p. 2105

Griffin D. W., Westphal D. L., Gray M. A., Airborne microorganisms in the African desert dust corridor over the mid-Atlantic ridge, Ocean Drilling Program, Leg 209, Aerobiologia, 2006, vol. 22, p. 211

Harrison R. M., Jones A. M., Biggins P. D., Pomeroy N., Cox C. S., Kidd S. P., Hobman J. L., Brown N. L., Beswick A., Climate factors influencing bacterial count in background air samples, International journal of biometeorology, 2005, vol. 49, p. 167

Heidari A., An Analytical and Computational Infrared Spectroscopic Review of Vibrational Modes in Nucleic Acids, Austin J Anal Pharm Chem, 2016, vol. 3, p. 1058

Imshenetsky A., Lysenko S., Kazakov G., Upper boundary of the biosphere., Applied and environmental microbiology, 1978, vol. 35, p. 1

Jones B. E., Grant W. D., Duckworth A. W., Owenson G. G., Microbial diversity of soda lakes, Extremophiles, 1998, vol. 2, p. 191

Kaltenegger L., How to characterize habitable worlds and signs of life, Annual Review of Astronomy and Astrophysics, 2017, vol. 55, p. 433

Karl D., Bird D., Björkman K., Houlihan T., Shackelford R., Tupas L., Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica, Science, 1999, vol. 286, p. 2144

Kasting J. F., Whitmire D. P., Reynolds R. T., Habitable Zones around Main Sequence Stars, Icarus, 1993, vol. 101, p. 108

Kawaguchi S., Kambara O., Shibata M., Kandori H., Tominaga K., Low-frequency dynamics of bacteriorhodopsin studied by terahertz time-domain spectroscopy, Physical Chemistry Chemical Physics, 2010, vol. 12, p. 10255

Kenyon S., Hartmann L., Spectral energy distributions of T Tauri stars-Disk flaring and limits on accretion, The Astrophysical Journal, 1987, vol. 323, p. 714

Kopparapu R. K., Ramirez R., Kasting J. F., Eymet V., Robinson T. D., Mahadevan S., Terrien R. C., Domagal-Goldman S., Meadows V., Deshpande R., Habitable Zones around Main-sequence Stars: New Estimates, ApJ, 2013, vol. 765, p. 131

Landis G. A., Martian water: are there extant halobacteria on Mars?, Astrobiology, 2001, vol. 1, p. 161

Lanoil B., Skidmore M., Priscu J. C., Han S., Foo W., Vogel S. W., Tulaczyk S., Engelhardt H., Bacteria beneath the West Antarctic ice sheet, Environmental Microbiology, 2009, vol. 11, p. 609

Le-Tien C., Lafortune R., Shareck F., Lacroix M., DNA analysis of a radiotolerant bacterium Pantoea agglomerans by FT-IR spectroscopy, Talanta, 2007, vol. 71, p. 1969

Lewis R. N., McElhaney R. N., Vibrational spectroscopy of lipids, Handbook of vibrational spectroscopy, 2006

Lighthart B., The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere, FEMS Microbiology Ecology, 1997, vol. 23, p. 263

Lindemann J., Constantinidou H. A., Barchet W. R., Upper C. D., Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria, Applied and environmental microbiology, 1982, vol. 44, p. 1059

Lindow S. E., Brandl M. T., Microbiology of the phyllosphere, Applied and environmental microbiology, 2003, vol. 69, p. 1875

Macher J., Biological Aerosol, 12. In Annual Meeting of American Association for Aerosol Research, Tutorial Session , vol. 10, 1993

McKay C. P., Porco C. C., Altheide T., Davis W. L., Kral T. A., The possible origin and persistence of life on Enceladus and detection of biomarkers in the plume, Astrobiology, 2008, vol. 8, p. 909

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J., , 2003 Brock Microbiología de los microorganismos

Maki T., Susuki S., Kobayashi F., Kakikawa M., Yamada M., Higashi T., Chen B., Shi G., Hong C., Tobo Y., et al., Phylogenetic diversity and vertical distribution of a halobacterial community in the atmosphere of an Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang City, Air Quality, Atmosphere & Health, 2008, vol. 1, p. 81

Mantsch H. H., Chapman D., et al., Infrared spectroscopy of biomolecules. Wiley-Liss, 1996

Martin S., Andreae M., Althausen D., Artaxo Netto P. E., Baars H., Borrmann S., Chen Q., Farmer D., Guenther A., Gunthe S., et al., An overview of the Amazonian aerosol characterization experiment 2008 (AMAZE-08), Atmospheric Chemistry and Physics, 2010, vol. 10, p. 11415

Matthias-Maser S., Jaenicke R., The size distribution of primary biological aerosol particles with radii¿ 0.2 μm in an urban/rural influenced region, Atmospheric Research, 1995, vol. 39, p. 279

Mayor M., Queloz D., A Jupiter-mass companion to a solar-type star, Nature, 1995, vol. 378, p. 355

Miquel P., Les organismes vivants de l'atmosphère. Gauthier-Villars, 1883

Mojzsis S. J., Arrhenius G., McKeegan K., Harrison T., Nutman A., Friend C., Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago, Nature, 1996, vol. 384, p. 55

Morris C., Kinkel L., Lindow S., Hecht-Poinar E., Elliott V., Phyllosphere microbiology, eds. Lindow SE, Hecht-Poinar EI, and Elliot V, APS Press, St. Paul, 2002, pp 365–375

Movasaghi Z., Rehman S., ur Rehman D. I., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues, Applied Spectroscopy Reviews, 2008, vol. 43, p. 134

Napier W., A mechanism for interstellar panspermia, Monthly Notices of the Royal Astronomical Society, 2004, vol. 348, p. 46

Naumann W., Reversible fluorescence quenching: Generalized Stern–Volmer equations on the basis of self-consistent quenching constant relations, The Journal of Chemical Physics, 2000, vol. 112, p. 7152

Nicholson J., Jasapara J., Rudolph W., Omenetto F., Taylor A., Full-field characterization of femtosecond pulses by spectrum and cross-correlation measurements: addenda, Optics letters, 2000, vol. 25, p. 138

Nisbet E., Sleep N., The habitat and nature of early life, Nature, 2001, vol. 409, p. 1083

NOAA U., Force U. A., , 1976 Technical report US standard atmosphere, 1976. NOAA-S/T

O'dowd C. D., Facchini M. C., Cavalli F., Ceburnis D., Mircea M., Decesari S., Fuzzi S., Yoon Y. J., Putaud J.-P., Biogenically driven organic contribution to marine aerosol, Nature, 2004, vol. 431, p. 676

Oren A., Dubinsky Z., On the red coloration of saltern crystallizer ponds. II. Additional evidence for the contribution of halobacterial pigments, International Journal of Salt Lake Research, 1994, vol. 3, p. 9

Paulino-Lima I. G., Pilling S., Janot-Pacheco E., de Brito A. N., Barbosa J. A. R. G., Leitão A. C., Lage C. d. A. S., Laboratory simulation of interplanetary ultraviolet radiation (broad spectrum) and its effects on Deinococcus radiodurans, Planetary and Space Science, 2010, vol. 58, p. 1180

Pearce D. A., Bridge P. D., Hughes K. A., Sattler B., Psenner R., Russell N. J., Microorganisms in the atmosphere over Antarctica, FEMS Microbiology Ecology, 2009, vol. 69, p. 143

Peccia J., Hospodsky D., Bibby K., New directions: a revolution in DNA sequencing now allows for the meaningful integration of biology with aerosol science, Atmospheric Environment, 2011, vol. 45, p. 1896

Pedersen K., Microbial life in deep granitic rock, FEMS microbiology reviews, 1997, vol. 20, p. 399

Penner J. E., Hegg D., Leaitch R., , 2001 Peer Reviewed: Unraveling the role of aerosols in climate change

Pham T., Ganel O., Thronson H., NASA's physics of the cosmos and cosmic origins programs manage strategic astrophysics technology development in preparation for the next decadal survey. In Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series , vol. 10698 of Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series, 2018, p. 106986J

Pomeroy J., Jones H., , 1996 in , Chemical exchange between the atmosphere and polar snow. Springer pp 453–489

Porco C., Helfenstein P., Thomas P., Ingersoll A., Wisdom J., West R., Neukum G., Denk T., Wagner R., Roatsch T., et al., Cassini observes the active south pole of Enceladus, science, 2006, vol. 311, p. 1393

Prenni A. J., Petters M. D., Kreidenweis S. M., Heald C. L., Martin S. T., Artaxo P., Garland R. M., Wollny A. G., Pöschl U., Relative roles of biogenic emissions and Saharan dust as ice nuclei in the Amazon basin, Nature Geoscience, 2009, vol. 2, p. 402

Priscu J. C., Adams E. E., Lyons W. B., Voytek M. A., Mogk D. W., Brown R. L., McKay C. P., Takacs C. D., Welch K. A., Wolf C. F., et al., Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica, Science, 1999, vol. 286, p. 2141

Rasmussen R. A., Went F., Volatile organic material of plant origin in the atmosphere, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1965, vol. 53, p. 215

Raulin F., Exo-astrobiological aspects of Europa and Titan: from observations to speculations, Space Science Reviews, 2005, vol. 116, p. 471

Rogers L. A., The collection of microorganisms above 36,000 feet, Natio Geographic Soc Stratosphere Series, 1936, vol. 2, p. 146

Rosenfeld D., Lohmann U., Raga G. B., O'dowd C. D., Kulmala M., Fuzzi S., Reissell A., Andreae M. O., Flood or drought: How do aerosols affect precipitation?, science, 2008, vol. 321, p. 1309

Rothschild L. J., Mancinelli R. L., Life in extreme environments, Nature, 2001, vol. 409, p. 1092

Rubin R. H., Colgan S. W., Dufour R. J., Lord S. D., The He+/H+ Abundance in the Orion Nebula from Infrared Space Observatory Measurements, The Astrophysical Journal Letters, 1998, vol. 501, p. L209

Sagan C., Thompson W. R., Carlson R., Gurnett D., Hord C., A search for life on Earth from the Galileo spacecraft, Nature, 1993, vol. 365, p. 715

Schleper C., Puehler G., Holz I., Gambacorta A., Janekovic D., Santarius U., Klenk H.-P., Zillig W., Picrophilus gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoaci-

dophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0., Journal of bacteriology, 1995, vol. 177, p. 7050

Shaffer B., Lighthart B., Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: urban, rural, forest, and coastal, Microbial ecology, 1997, vol. 34, p. 167

Sheridan P. P., Miteva V. I., Brenchley J. E., Phylogenetic analysis of anaerobic psychrophilic enrichment cultures obtained from a Greenland glacier ice core, Applied and Environmental Microbiology, 2003, vol. 69, p. 2153

Skidmore M., Anderson S. P., Sharp M., Foght J., Lanoil B. D., Comparison of microbial community compositions of two subglacial environments reveals a possible role for microbes in chemical weathering processes, Applied and Environmental Microbiology, 2005, vol. 71, p. 6986

Skoog D., Leary J., Principles of Instrumental Analysis, Harcourt Brace College Publishers, Fort Worth, 1992

Smith E. A., Cooper H. J., Xiang X., Mugnai A., Tripoli G. J., Foundations for statistical-physical precipitation retrieval from passive microwave satellite measurements. Part I: Brightness-temperature properties of a time-dependent cloud-radiation model, Journal of Applied Meteorology, 1992, vol. 31, p. 506

Stan-Lotter H., McGenity T. J., Legat A., Denner E. B., Glaser K., Stetter K. O., Wanner G., Very similar strains of Halococcus salifodinae are found in geographically separated Permo-Triassic salt deposits, Microbiology, 1999, vol. 145, p. 3565

Stuart B., , 2004 IR Spectroscopy: Fundamentals and Applications–Analytical Techniques in the Sciences

Taillandier E., Liquier J., Vibrational spectroscopy of nucleic acids, Handbook of vibrational spectroscopy, 2006

Tilley R. I., Ho J., Eamus D., , 2001 Technical report Background bioaerosols and aerosols at two sites in northern Australia: Preliminary measurements. DEFENCE SCIENCE AND TECHNOLOGY ORGANISATION VICTORIA (AUSTRALIA) AERONAUTICAL AND MARITIME RESEARCH LAB

Tong Y., Diurnal distribution of total and culturable atmospheric bacteria at a rural site, Aerosol Science and Technology, 1999, vol. 30, p. 246

Tung H., Bramall N., Price P., Microbial origin of excess methane in glacial ice and implications for life on Mars, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, vol. 102, p. 18292

Urey H. C., On the early chemical history of the earth and the origin of life, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1952, vol. 38, p. 351

Vázquez M., Pallé E., Rodríguez P. M., The Earth as a distant planet: a Rosetta stone for the search of Earth-like worlds. Springer Science & Business Media, 2010

Wainwright M., Wickramasinghe N. C., Narlikar J., Rajaratnam P., Perkins J., Bacteria in the stratosphere: confirmation of the presence of viable but noncultureable forms. In Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology VII , vol. 5163, 2004, p. 218

Walker J. C., Carbon dioxide on the early Earth, Origins of Life and Evolution of the Biosphere, 1985, vol. 16, p. 117

Warneck P., Chemistry of the natural atmosphere: International geophysical series, Vol. 41, New York: Academic, 1988

Weiss L. M., Marcy G. W., The mass-radius relation for 65 exoplanets smaller than 4 Earth radii, The Astrophysical Journal Letters, 2014, vol. 783, p. L6

Went F., Organic matter in the atmosphere, and its possible relation to petroleum formation, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1960, vol. 46, p. 212

Whitby J., Burgess R., Turner G., Gilmour J., Bridges J., Extinct 129I in halite from a primitive meteorite: Evidence for evaporite formation in the early solar system, Science, 2000, vol. 288, p. 1819

Whon T. W., Kim M.-S., Roh S. W., Shin N.-R., Lee H.-W., Bae J.-W., Metagenomic characterization of airborne viral DNA diversity in the near-surface atmosphere, Journal of virology, 2012, pp JVI–00293

Witkin E. M., Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli., Bacteriological reviews, 1976, vol. 40, p. 869

Wood B. R., The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues, Chemical Society Reviews, 2016, vol. 45, p. 1980

Yang Y., Yokobori S.-i., Yamagishi A., Assessing panspermia hypothesis by microorganisms collected from the high altitude atmosphere, Biological Sciences in Space, 2009, vol. 23, p. 151

Yu C., Irudayaraj J., Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy, Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 2005, vol. 77, p. 368

Zahnle K. J., Kasting J. F., Pollack J. B., Evolution of a steam atmosphere during Earth's accretion, Icarus, 1988, vol. 74, p. 62

Zharkov V. M., Perturbation theory and the exchange interaction in the one-dimensional Hubbard model, Theoretical and Mathematical Physics, 1981, vol. 46, p. 88

Zolensky M. E., Bodnar R. J., Gibson E. K., Nyquist L. E., Reese Y., Shih C.-Y., Wiesmann H., Asteroidal water within fluid inclusion-bearing halite in an H5 chondrite, Monahans (1998), Science, 1999, vol. 285, p. 1377

Zolotov M. Y., An oceanic composition on early and today's Enceladus, Geophysical Research Letters, 2007, vol. 34

Apêndice

Apêndice A

Caracterização espectroscópica de lipídeos e proteínas

Os lipídeos constituem uma classe de moléculas ricas em carbono e hidrogênio, contendo também oxigênio, enxofre, nitrogênio e fósforo. A maioria dos lipídeos não é solúvel em água e possui uma "cabeça" polar (hidrofílica) e uma cauda apolar (hidrofóbica) que, em ambientes aquosos, conferem-lhes uma configuração muito especial denominada bicamada lipídica; ela se forma quando há uma associação entre as partes hidrofóbicas da molécula ao mesmo tempo que regiões hidrofílicas ficam expostas à água, formando uma verdadeira barreira de separação entre dois meios. Existem vários tipos de lipídeos, entre eles as vitaminas, os esteróides e os ácidos graxos.

Segundo Lewis e McElhaney (2006), o espectro de absorção dos lipídeos tem sua origem nas vibrações moleculares oriundas da interação da radiação infravermelha com as suas componentes estruturais (polar, intermediária e apolar). O interesse por essas moléculas surge do fato que elas constituem a base estrutural de todas as membranas biológicas. A tabela $A.1$ apresenta algumas das principais absorções atribuídas a um grupo específico de lipídeos, os fosfolipídeos.

Tabela A.1 - Principais valores de bandas marcadoras atribuídas a moléculas de lipídeos. Baseada em Stuart (2004).

Principais bandas no infravermelho atribuídas a lipídeos	
Número de onda (cm^{-1})	Possível atribuição
3010	Estiramento C-H
2956	Estiramento assimétrico CH_3
2920	Estiramento assimétrico CH_2
2870	Estiramento simétrico CH_3
2850	Estiramento simétrico CH_2
1730	Estiramento C=O
1485	Dobramento assimétrico $(CH_3)_3N+$
1473, 1472, 1468, 1463	CH_2 "scissoring"
1460	Dobramento assimétrico CH_3
1405	Dobramento simétrico $(CH_3)_3N+$
1378	Dobramento simétrico CH_3
1400 - 1200	CH_2 "wagging band progression"
1228	Estiramento assimétrico PO_2-
1170	Estiramento assimétrico CO-O-C
1085	Estiramento simétrico PO_2-
1070	Estiramento simétrico CO-O-C
1047	Estiramento C-O-P
972	Estiramento assimétrico $(CH_3)_3N+$
820	Estiramento assimétrico P-O
730, 720, 718	CH_2 "rocking"

Geralmente, as mais intensas vibrações no espectro dos lipídeos são oriundas do estiramento CH_2, o que gera fortes absorções na faixa entre 3100 e 2800 cm^{-1}, mais especificamente 2920 ou 2851 cm^{-1} (estiramentos assimétricos ou simétricos). Uma prévia atenção deve ser tomada com a sensibilidade do padrão destas bandas com as mudanças na conformação estrutural da molécula, o que pode causar pequenos *shifts* no espectro (Stuart, 2004).

Os organismos utilizam 20 aminoácidos para a produção de proteínas que desempenham funções bioquímicas singulares. As proteínas são moléculas que podem ser descritas como uma cadeia de aminoácidos unidos por ligações peptídicas em uma sequência específica. Do ponto de vista espectroscópico, as proteínas exibem bandas de absorção associadas principalmente ao grupamento amida (Fabian et al., 2000). A tabela $A.2$ lista algumas características de absorção das bandas do grupo amida, que estão relacionadas às proteínas.

Tabela A.2 - Principais valores de bandas marcadoras atribuídas a amidas de proteínas. Baseada em Stuart (2004).

Principais bandas atribuídas a Amidas		
Tipo	Número de onda (cm^{-1})	Possível atribuição
A	3300	Estiramentos N-H, C=O, C-N e dobramentos N-H
B	3110	Estiramentos N-H, C=O, C-N e dobramentos N-H
I	1653	Estiramentos N-H, C=O, C-N e dobramentos N-H
II	1567	Dobramento N-H e estiramento C-N.
III	1299	Estiramento C-N, dobramento N-H, estiramento C=O e estiramento O=C-N
IV	627	Dobramento O=C-N
V	725	Dobramento N-H
VI	600	Dobramento C=O
VII	200	Torsão C-N

Principais valores de bandas marcadoras atribuídas a amidas de proteínas. Baseada em Stuart (2004).

Em estudos mais detalhados, as cadeias laterais dos aminoácidos devem ser considerados na análise, pois podem contribuir significativamente para a identificação de grupos específicos em certas faixas espectrais. A tabela $A.3$ traz algumas bandas características de algumas cadeias laterais de aminoácidos.

Tabela A.3 - Principais valores de bandas marcadoras atribuídas a aminoácidos. Baseada em Stuart (2004).

Principais bandas atribuídas a Aminoácidos		
Aminoácido	Número de onda (cm^{-1})	Possível atribuição
Alanina	1465	Dobramento CH_2
Valina	1450	Dobramento assimétrico CH_3
Leucina	1375	Dobramento simétrico CH_3
Serina	1350 - 1250	Dobramento O-H
Ácido aspártico	1720	Estiramento C=O
Ácido glutâmico	1560	Estiramento assimétrico CO_2-
	1415	Estiramento simétrico CO_2-
Asparagina	1650	Estiramento C=O
Glutamina	1615	Dobramento NH_2
Lisina	1640 – 1610, 1550 – 1485	Dobramento NH_3+
	1160, 1100	"NH_3+ rocking"
Fenilalanina	1602, 1450, 760, 700	Vibrações de anéis benzenicos
Tirosina	1600, 1450	Vibrações de anéis benzenicos
Arginina	1608,1586	Vibrações de anéis benzenicos

Apêndice B

Experimentos atmosféricos - sonda suborbital

Destinada a coletar material orgânico vivo e inanimado na atmosfera terrestre, a sonda suborbital visa explorar sítios localizados no Estado de São Paulo. Um resumo do projeto é apresentado abaixo.

B.1 Preparação do módulo de coleta do material atmosférico

A unidade de coleta consiste de um suporte cilíndrico, cuja circunferência externa é ocupada por 5 filtros, recobertos por outro cilindro rotativo, ficando apenas uma janela exposta por vez à atmosfera. Os filtros de papel onde serão coletadas as amostras, foram exaustivamente esterilizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da USP em Ribeirão Preto (SP). O tratamento consistiu em imersão durante uma noite num banho de etanol a 70 porcento e na noite subsequente em acetona a 100 porcento. Em seguida, as amostras foram secadas em câmara estéril e em seguida autoclavadas a 180 Celsius por 2 horas (procedimento adaptado de (Wainwright et al., 2004). Uma amostra de filtro de papel será mantida numa câmara estéril para servir de controle de solo, no caso de ocorrerem eventuais contaminações.

B.2 Coleta dos materiais

A unidade de coleta será colocada dentro de uma gôndola, suspensa a uma altura de dois metros de um balão de Hélio. Após o lançamento, o sistema coletor permanecerá fechado até uma altura considerada altamente contaminada por poluição, classicamente definida como 11 km, altitude conhecida como limite de voos de jatos comerciais. Isso assegurará que os filtros não serão contaminados com excesso de poluentes e partículas,

que poderiam mascarar a esperada detecção de tênues quantidades de biomarcadores que se sabe estarem presentes na atmosfera.

A partir de 11 km, os filtros de papel serão expostos durante 1 km, a cada 5 km: a 12, 17, 22, 27 e 32 km. Durante a abertura da câmara e o começo do bombeamento de ar através dos filtros, os volumes de ar coletado serão estimados por meio de um medidor de pressão, afim de possibilitar o cálculo de quantidade de células/massas moleculares presente nos volumes coletados.

O cilindro metálico interior será coberto por uma grade de filtros de papel numerados e colocado dentro de outro cilindro metálico. Uma janela será aberta para permitir que a amostra seja depositada no filtro, que se encontra bem em frente desta janela durante 1 km. O conjunto coletor está colocado dentro de uma caixa em formato de cubo, contendo um mecanismo de abertura. Após cada exposição, a janela externa será fechada e o bombeamento de ar interrompido. Então, o cilindro interior gira afim de expor o próximo filtro, quando o balão atingir a nova altitude de coleta.

A sequência de operações durante as coletas seguirá as seguintes etapas:

i) O filtro de número 1 será exposto à janela do cilindro externo, mas a caixa externa estará fechada e o ar só começará a ser bombeado após o balão atingir 12 km;

ii) Em uma altitude de 12 km a janela externa se abre e o bombeamento força o ar a colidir com o filtro de papel, depositando o material atmosférico durante um espaço de 1 km;

iii) A 13 km, a caixa externa fecha novamente, cessando o bombeamento. O cilindro interno com sua grade de filtros gira, afim de colocar o filtro subsequente diante da janela de coleta;

iV) O processo se repete a 17 km como em ii). Procedimentos similares de abertura e fechamento devem ocorrer até 32 km de altitude. Depois da última coleta, o experimento se liberará do balão e começará sua descida, munido de um paraquedas. A caixa metálica estará fechada, protegendo o material coletado. Os volumes de ar coletados durante cada medida ao longo de 1 km de deslocamento serão medidos por um pressurímetro e os fluxos UV (A, B e C) igualmente registrados durante todo o voo.

B.3 Análise das amostras

Cada filtro será dividido em quatro partes de tamanhos iguais e cada parte vai ser submetida a um certo tipo de análise, como ilustrado no esquema abaixo:

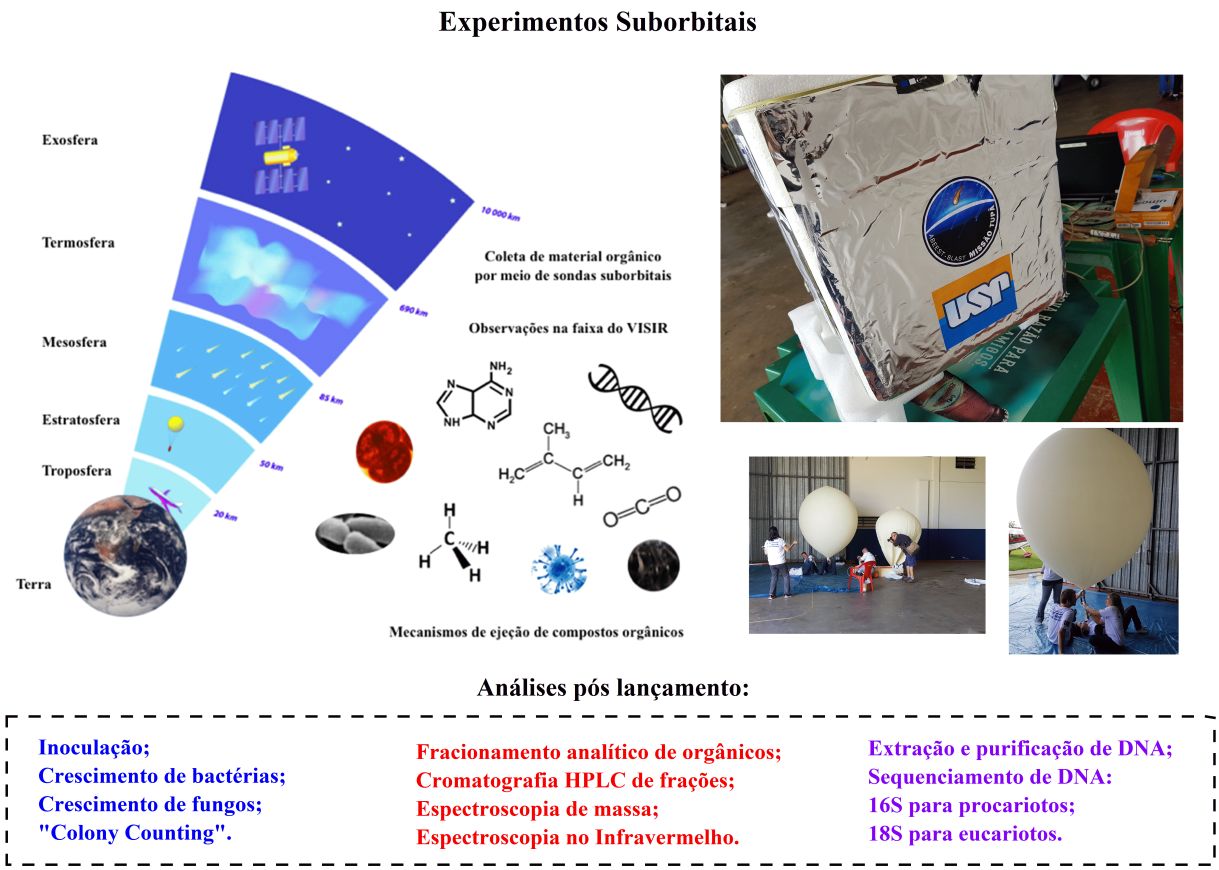

Figura B.1: Montagem da sonda suborbital e os métodos utilizados para a análise do conteúdo da atmosfera terrestre.

Processamento de dados:

a) Contagem de micro-organismos: colônias isoladas de bactérias e fungos serão identificadas em termos do meio em que cresceram, bem como em termos de morfologia. A identificação de colônias será cotejada com dados de sequenciamento de DNA; logo após o procedimento descrito será feito a quantificação final das diferentes espécies. Os resultados serão expressos em termos da quantidade total de cada espécie, obtida a partir das sequências totais de DNA, por litro de ar, e para cada altitude.

b) Análise química: os materiais orgânicos detectados serão quantificados por espectrometria de massa em termos da porcentagem em relação à quantidade total coletada por litro e a cada altitude. Será construído um perfil químico qualitativo e quantitativo da

distribuição de material orgânico em função da altitude, ao longo da coluna de 20 km do voo.

c) Análise dos componentes fluorescentes: pigmentos e outras substâncias aromáticas com características fluorescentes serão quantificadas por meio de espectrofluorimetria. Os picos principais, cromatografados por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), serão selecionados e submetidos a fluorimetria para a identificação dos compostos fluorescentes. Os resultados serão expressos em termos da quantidade de compostos fluorescentes por litro de ar, para cada altitude.

d) Espectroscopia no infravermelho (IR): uma parte do material coletado que passou por HPLC, será submetido a espectroscopia no infravermelho para identificação de suas características espectrais. Assim, as assinaturas espectrais no infravermelho serão geradas para cada componente importante encontrado nas coletas, e também para a mistura do conjunto obtida em cada altitude. Um espectro integrado de todo o material coletado ao longo dos 20 km será igualmente gerado para que se tenha a assinatura infravermelha de uma atmosfera "viva", isto é, contaminada por micro-organismos e material orgânico em geral. Esse espectro será muito útil para ser comparado com espectros de exoplanetas.