Thays Pontes Bentes

Resposta biológica de *Halobacterium salinarum* NRC-1 em simulação ao ambiente marciano

São José dos Campos, SP\$2018\$

Thays Pontes Bentes

Resposta biológica de *Halobacterium salinarum* NRC-1 em simulação ao ambiente marciano

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, como parte do processo de avaliação para a obtenção do título de Mestre em Física e Astronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Cristina Krabbe Coorientador: Prof. Dr. Fabio Rodrigues

São José dos Campos 2018





TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Bentes, Thays Pontes Resposta biológica de Halobacterium salinarum NRC-1 em simulação ao ambiente marciano / Thays Pontes Bentes; orientadora, Profa. Dra. Ângela Cristina Krabbe; co-orientador Prof. Dr. Fabio Rodrigues. - São José dos Campos, SP, 2018. 1 CD-ROM, 71 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia.

Inclui referências

1. Física e Astronomia. 2. Astrobiologia. 3. Marte. 4. Halobacterium salinarum. I. Krabbe, Profa. Dra. Ângela Cristina, orient. II. Rodrigues, Prof. Dr. Fabio, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia. IV. Título.

Eu, Thays Pontes Bentes, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 24 de Agosto de 2018.

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 27 / 02 / 2018





THAYS PONTES BENTES

"RESPOSTA BIOLÓGICA DE Halobacterium salinarum NRC-1 EM SIMULAÇÃO AO AMBIENTE MARCIANO."

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF. DR. FRANCISCO CARLOS ROCHA FERNANDES	
PROF.ª DR.ª ANGELA CRISTINA KRABBE Angela Kicht	
PROF. DR. FABIO RODRIGUES IQ-USP Zabia Moduig	
PROF.ª DR.ª DIANA PAULA DE PINHO ANDRADE OV-UFRJ_ Pondrade	

Prof. Dr. Leandro José Raniero

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 27 de Fevereiro de 2018.

À minha querida família.

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus colegas e amigos que me incentivaram a ter a coragem necessária para embarcar neste projeto. Tive a oportunidade de ter uma orientadora que não teve medo de grandes desafios e que me ensinou a buscar a minha independência intelectual. Obrigada Ângela, por seu incentivo e bom humor.

Agradeço ao meu coorientador, Fabio, por ter me acompanhado e me apoiado desde o começo da minha jornada científica. Sua contribuição foi fundamental para o meu amadurecimento intelectual.

Aos meus colegas da Univap que me apoiaram durante os momentos mais difíceis de trabalho. À Sarita pelo incentivo e autêntico café.

Aos companheiros de bancada, por toda ajuda, em especial Tamires Gallo, Gabriel Araújo, Gabriel Gonçalves e Evandro Resende. À Vanise de Medeiros pelo convívio e longas noites filosóficas.

A toda equipe do Laboratório de Astrobiologia - Astrolab/USP e Laboratório Nacional de Luz Sincontrom - LNLS/CNPEM. Ao Prof. Dr. Douglas Galante por todo ensinamento, paciência e apoio durante a realização dos experimentos.

À equipe do Laboratório de Biologia Sistêmica de Microrganismos - LaBiSisMi/USP, pela ajuda necessária para o cultivo, em especial, a Profa. Dra. Tie Koide por ter cedido a cepa estudada.

Agradeço minha família que sempre me incentivou a buscar meus sonhos e seguir meu próprio caminho.

Agradeço, por fim, à CAPES, que financiou meu mestrado.

Cada um de nós é, na perspectiva cósmica, precioso. Se um ser humano discordar de você, deixe-o viver. Em cem

bilhões de galáxias, vocé não encontrará outro.

Carl Sagan

* 1934, † 1996

Resumo

A existência de arqueias halófilas viáveis em sedimentos de idade geológica (milhões de anos) reforça a capacidade da vida microbiana halofílica pretérita ter a possibilidade de estar preservada em superfície e sub-superfície marciana. Selecionamos a arqueia halófila Halobacterium salinarum NRC-1 como modelo neste estudo, por ser um microrganismo poliextremófilo, ou seja, que naturalmente resiste a múltiplos fatores estressores no próprio ambiente, conhecido principalmente por depender de altas concentrações de sal para o crescimento, ou mesmo viver incrustada em cristais de sal, ainda viável há centenas de anos. A célula de H. salinarum NRC-1 confere uma adaptabilidade excepcional, consistindo em diferentes tipos de aparatos funcionais que permitem a sobrevivência a extremos de dessecação, radiação UV, radiação ionizante e estresse de oxigênio. Notavelmente, a versatilidade da espécie em diferentes condições pode auxiliar no desenvolvimento de metodologias para busca de vida em Marte, ou nas questões sobre o transporte interplanetário de microrganismos dentro de meteoritos contendo halita. Submetemos a arqueia em condições crescentes de sais de sulfato magnésio e perclorato de sódio e magnésio, essas concentrações foram compatíveis com as detectadas em Marte. H. salinarum NRC-1 apresentou crescimento em todas as concentrações analisadas, desta forma, pode-se considerar a arqueia como uma espécie extremofílica percloratorresistente. Isto permite compreender os limites da vida sob a perspectiva de Marte. Este trabalho buscou explorar como biomoléculas extraídas de H. salinarum NRC-1, podem ser preservadas no ambiente, gerando bioassinatura, ou seja, sinais indiretos de vida. De maneira sucinta, esse microrganismo possui pigmentos essenciais para seu metabolismo, como carotenoides, bacterioruberinas e bacteriorodopsina, que podem ser usadas como bioassinaturas. Esses pigmentos foram analisados por espectroscopia Raman e UV-Visível, incluindo mistura com substratos inorgânicos como CaCO₃ e SiO₂, além de células lisadas na presença de água destilada e extração com metanol. Essas misturas foram expostas ao UV-C por diferentes tempos de exposição, a fim de verificar a possibilidade da preservação dos carotenoides em contexto marciano. Após análise, concluímos que os cenários impostos para a preservação das biomoléculas em substratos de CaCO₃ e SiO₂ não conferem proteção aos carotenoides. Percebemos a degradação gradual dos carotenoides de células lisadas e biomoléculas extraídas com metanol durante o tempo de exposição ao UV-C. Propomos diferentes análises para mensurar a degradação de carotenoides e a capacidade de resistência e sobrevivência de H. salinarum NRC-1 em ambiente marciano simulado. Este estudo produziu conhecimentos fundamentais para a compreensão dos limites da vida terrestre, ressaltando os halófilos extremos como os candidatos mais prováveis para sobreviver em Marte.

Palavras-chave: Astrobiologia; Marte; *Halobacterium salinarum* NRC-1; Bioassinaturas.

Abstract

The existence of viable haloarchaea in sediments of geological age (millions of years) enhances the possibility of past halophilic microbial life to be preserved in Martian surface and sub-surface. We selected the archaea Halobacterium salinarum NRC-1 as the model in this study, because it is a polyextremophilic microorganism, in the sense that it naturally resists multiple stressors in the environment it self, known mainly as relying on high concentrations of salt to grow, or even to live encrusted in crystals of salt, encrusted in crystals of salt, still via for hundreds of years. In addition, they have the ability to survive extremes of desiccation, UV radiation, ionizing radiation and oxygen stress. Notably, the versatility of this species under different conditions may aid in the development of methodologies to search for life on Mars, or in questions about interplanetary transport of microorganisms within halite-containing meteorites. We subjected the archaea to increasing conditions of magnesium sulphate and sodium and magnesium perchlorate salts, and these concentrations were compatible with those detected on Mars. H. salinarum NRC-1 showed growth in all the analyzed concentrations and, thus, archaea can be considered as an endophilic perchlorate-resistant species. This allows us to understand the limits of life under the Martian perspective. This work aimed to explore how biomolecules extracted from *H. salinarum* NRC-1, can be preserved in the environment, generating biosignature, that is, indirect signs of life. Briefly, this microorganism possesses essential pigments for their metabolism, such as carotenoids, bacterio-ruberins and bacterio-rhodopsin, that can be used as bio-signatures. These pigments were analyzed by Raman and UV-Visible spectroscopy, including mixing with inorganic substrates such as CaCO3 and SiO2, as well as cells lysed in the presence of distilled water and extraction with methanol. These mixtures were exposed to UV-C for different exposure times in order to verify the possibility of carotenoid preservation in a Martian context. After analysis, we conclude that the scenarios imposed for the preservation of the biomolecules in substrates of CaCO3 and SiO2 do not confer protection to the carotenoid. We note the gradual degradation of carotenoids from lysed cells and biomolecules extracted with methanol during the exposure to UV-C. We propose different types of analysis to measure the degradation of carotenoids and the resistance and survival capacity of H. salinarum NRC-1 in simulated Martian environment. This study produced fundamental knowledge for the understanding the limits of terrestrial life, emphasizing the extreme halophiles as the most likely candidates to survive on Mars.

Keywords: Astrobiology; Mars; Halobacterium salinarum NRC-1; Biosignatures.

Lista de ilustrações

Figura 1 -	– Árvore filogenética	14
Figura 2 - Figura 3 -	 Taxa de crescimento de microrganismos em relação à salinidade Exemplos de <i>Halobacterium salinarum</i>: A) Colônias crescendo em placa de ágar com sal saturado. B) Imagem microscópica eletrônica com uma 	18
	ampliação de 13.500 vezes. C) Crescimento maciço em ambiente hiper-	20
Figura 4 -	- Comparação das estruturas moleculares de β -caroteno e bacterioruberina.	20 22
Figura 5	- Representação esquemática das quatro proteínas da retina de Halobac-	
	terium salinarum	23
Figura 6	– Exemplos de ambientes salinos e hipersalinos	25
Figura 7 -	– Meridiani Planum	27
Figura 8 -	 Perspectivas de futuras missões astrobiológicas em Marte (a) Schia- parelli. (b) Rover ExoMars 2020. (c) Candidatos para plataforma de 	
	pouso	29
Figura 9 -	- Esquema geral representando o espectro Raman e os possíveis espalha- mentos Anti-Stokes, Rayleigh e Stokes	30
Figura 10	-Crescimento com sulfato de magnésio	32
Figura 11	-Crescimento <i>H. salinarum</i> NRC-1 em diferentes concentrações de per- clorato de magnésio.	33
Figura 12	-Crescimento H . salinarum NRC-1 com diferentes concentrações de per-	
	clorato de sódio.	33
Figura 13	– Processos de crescimento, centrifugação e liofilização de Halobacterium	
	salinarum NRC-1	35
Figura 14	–Preparação das misturas e pastilhas.	36
Figura 15	–Fotos feitas em lupa das pastilhas irradiadas.	38
Figura 16	$-\operatorname{Processos}$ de produção de biomassa hidratada, diluição e irradiação	39
Figura 17	–Processos de evaporação, ressuspensão e irradiação	40
Figura 18	– Câmara de Simulação Espacial e Planetária (AstroCam) sendo operada	
	durante o experimento	41
Figura 19	–Fluxos medidos com filtro AMO em comparação com as formas es-	
	pectrais e intensidades do Sol na superfície de Marte e a emitida pelo	
	simulador solar dentro da AstroCam.	42

Figura 20	–Curva típica de crescimento de Halobacterium salinarum NRC-1 em	
	meio CM, analisada por densidade óptica (D.O. $_{600nm})$ e contagem de	
	células por Unidade de Formação de Colônias (UFC)	45
Figura 21	-Efeito de Sulfato de Magnésio no crescimento de $H.$ salinarum NRC-1.	46
Figura 22	–Ensaio de crescimento H. salinarum NRC-1. Gráfico mostra o cresci-	
	mento em concentrações crescentes de perclorato de sódio em período	
	de 110 horas após a inoculação. Barras de erro indicam o desvio padrão.	47
Figura 23	– Ensaio de crescimento <i>H. salinarum</i> NRC-1. Gráfico mostra o cresci-	
	mento em concentrações crescentes de perclorato de magnésio em pe-	
	ríodo de 110 horas após a inoculação. Barras de erro indicam o desvio	
	padrão.	48
Figura 24	-Fotos das placas mostrando o crescimento de $H.$ salinarum NRC-1, am-	
	bas na diluição de 100.000X em meio CM (controle), após a irradiação	
	ao UV-C.	49
Figura 25	-Fotos das placas mostrando o crescimento de H. salinarum NRC-1,	
	ambas na diluição de 100.000X em meio CM enriquecido com 1 mol/L	
	de $MgSO_4$, após a irradiação ao UV-C	50
Figura 26	-Fotos das placas mostrando o crescimento de H. salinarum NRC-1,	
	ambas na diluição de 100.000X em meio CM enriquecido com 0,2 mol/L	
	de NaClO ₄ , após a irradiação ao UV-C	50
Figura 27	$-{\rm Fotos}$ das placas mostrando o crescimento de $H\!\!.$ $salinarum$ NRC-1,	
	ambas na diluição de 100.000X em meio CM enriquecido com 0,2 mol/L	
	de $Mg(ClO_4)_2$, após a irradiação ao UV-C	51
Figura 28	$-\operatorname{Espectro}$ de absorção Raman obtidos das pastilhas não irradiadas	52
Figura 29	$-\operatorname{Espectro}$ de absorção Raman obtidos da pastilha de $H.$ $salinarum$ NRC-	
	$1~{\rm pura}$ (controle), irradiada com simulador solar UV ambiental por $5~$	
	minutos de exposição.	53
Figura 30	– Espectro de absorção Raman obtidos da pastilha de $H.\ salinarum$ NRC-	
	$1~{\rm pura},$ irradiada com simulador solar UV ambiental por 30 minutos de	
	exposição.	54
Figura 31	$-\operatorname{Espectro}$ de absorção Raman obtidos da pastilha (B1) da mistura de	
	<i>H. salinarum</i> NRC-1, pó de diamante e SiO ₂ , irradiada pelo simulador	
	solar UV ambiental por 30 minutos de exposição.	55
Figura 32	– Espectro de absorção Raman obtidos da mistura de $H.\ salinarum$ NRC-	
	1, pó de diamante e CaCO ₃ (B2), irradiada pelo simulador solar UV	
	ambiental por 30 minutos de exposição	56
Figura 33	-Espectros de absorção obtidos pelo UV-Vis da amostra C	58
Figura 34	–Espectros de absorção obtidos pelo UV-Vis da amostra D	59

Figura 35	-Comparação	das	intensidades	dos	picos	de	carot	enoi	de,	obt	idos	, po	or	
	espectroscopi	ia de	absorção ópt	ica U	JV-Vis	s								60

Lista de tabelas

Tabela 1 –	Exemplo dos parâmetros físicos e químicos que definem os organismos extremófilos.	17
Tabela 2 –	Comportamento da curva de crescimento <i>Halobacterium salinarum</i> NRC- 1 em meios enriquecidos com diferentes concentrações de sais de sulfato	94
	e perclorato.	34
Tabela 3 –	Especificação experimental e análise técnica de cada amostra	43

Lista de abreviaturas e siglas

ATP	Adenosina Trifosfato
Ar	Argônio
BR	Bacteriorodopsina
CO_2	Dióxido de Carbono
$CaCO_3$	Carbonato de Cálcio
CH_2	Metileno
CH_3	Metil
D.O. 600nm	Densidade Óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Fe	Ferro
HR	Halorodopsina
М	Concentração Molar
Mn	Manganês
Na^+	Íons de Sódio
N_2	Nitrogênio
K^+	Íons de Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
SRI	Rodopsina Sensorial I
SRII	Rodopsina Sensorial II
Si	Silício
SiO_2	Dióxido de Silício
UFC	Unidade de Formação de Colônias
UV	Radiação Ultravioleta
UVC	Radiação Ultravioleta C (100 até 280 nm)
UV-Vis	Espectroscopia no Ultravioleta Visível

Sumário

1	Intr	odução		14
	1.1	Objeti	vos	16
2	Rev	isão de	Literatura	17
	2.1	Vida e	em ambientes inóspitos e microrganismos extremófilos	17
	2.2	Adapt	ações à vida em alta salinidade	18
	2.3	Halobe	acterium salinarum NRC-1	19
		2.3.1	Biomoléculas	22
	2.4	Ambie	entes hipersalinos	24
	2.5	Perspe	ectivas Astrobiológicas em Marte	25
	2.6	Técnic	cas espectroscópicas	30
		2.6.1	Espectroscopia Raman	30
		2.6.2	Espectroscopia de absorção óptica UV-Vis	31
3	Mat	terial e	Métodos	32
	3.1	Exper	imentos de Crescimento em Meios Salinos	32
		3.1.1	Ensaio de Resistência ao Sulfato de Magnésio	32
		3.1.2	Ensaio de Resistência a Sais de Perclorato	33
	3.2	Exper	imentos de Sobrevivência à Radiação UV-C	34
	3.3	Condi	ções de Cultivo e Extração de Pigmentos	34
		3.3.1	Preparo de Pastilhas	36
		3.3.2	Espectroscopia Raman	37
		3.3.3	Exposição à Radiação UV-C	38
		3.3.4	Simulação da Superfície Marciana	40
4	Res	ultados	e Discussão	43
	4.1	Cresci	mento	44
	4.2	Sobrev	vivência	48
	4.3	Bioass	inatura	51
		4.3.1	Espectroscopia Raman	51
		4.3.2	Espectroscopia de absorção óptica UV-Vis	57
		4.3.3	Simulação da Superfície Marciana	59
5	Con	clusões	5	62
Re	eferêr	ncias .		64

1 Introdução

A Terra é um planeta habitado por uma ampla gama de organismos, mesmo os ambientes mais inóspitos estão repletos de vida, sobretudo microbiana. Como não se conhece outro modelo de vida que não seja a terrestre, pragmaticamente costuma-se estudar a vida microbiana em nosso planeta desde sua origem, como esta interage com o ambiente e como responde a mudanças ambientais, como modelo para o entendimento da possibilidade de vida em outros planetas. Desta forma, visa-se entender questões como quais são os limites físicos e químicos para a vida como a conhecemos, como modelo para compreender possíveis ambientes biofílicos fora da Terra.

O cenário científico atual utiliza o modelo de vida terrestre como único exemplo estudado até o momento. Nas últimas centenas de anos, o estudo de registros fósseis e a vida presente na biosfera terrestre possibilitaram a formação do sistema de classificação de caráter filogenético da vida, que compreende o sequenciamento dos seres vivos pela análise filogenética de RNA ribossomal 16S. Respectivamente, representados nos domínios *Bacteria, Archaea* e *Eukarya*, esquematizados na Figura 1.



Figura 1 – Árvore filogenética baseada no gene do RNA ribossomal 16S.

Os domínios da vida evidenciam grandes diferenças filogenéticas da biodiversidade terrestre. Os organismos do recente domínio *Archaea* apresentam características em comum com bactérias e eucariotos, além de características exclusivas. As arqueias são organismos procarióticos, ou seja, que não apresentam um núcleo definido por membrana, não apresentam organelas membranosas e possuem aspectos metabólicos semelhantes as bactérias, e se diferem de bactérias principalmente em composição química e na estruturação celular (OLSEN; WOESE, 1997). Com respeito aos aspectos informacionais e síntese proteica, as arqueias são mais semelhantes aos eucariotos (KOONIN; WOLF, 2008). Além disso, as arqueias possuem características totalmente diferentes de bactérias e eucariotos como, por exemplo, a presença de uma membrana citoplasmática exclusiva (WOESE; FOX, 1977).

A vida na Terra explora os nichos mais extremos. Os seres vivos que têm afinidades ou necessitam dessas condições extremas para a sobrevivência são comumente chamados de extremófilos (BROCK et al., 2010). São peculiares em vários aspectos por viverem em ambientes extremos amplamente diversificados. De modo genérico, os extremófilos em sua grande maioria são microrganismos e podem ser encontrados em hábitats com condições geoquímicas extremas de salinidade, pH, potencial de oxido-redução, temperatura, pressão e radiação (PAULINO-LIMA et al., 2011). A predominância dos extremófilos se encontra principalmente nos 2 dos 3 grandes domínios da vida, *Bacteria e Archaea*, ambos de microrganismos procariotos. Entretanto, alguns poucos extremófilos são encontrados no domínio *Eukarya* (BROCK et al., 2010). Os estudos destes microrganismos auxilia em novas hipóteses sobre as condições para a origem e evolução da vida na Terra e possivelmente, a vida em outros planetas (DIAS, 2015; ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001).

O conhecimento da vida em nosso planeta é fundamental para as pesquisas em astrobiologia, área inter e multidisciplinar com um vasto campo de conhecimento em diferentes áreas. Esta tem por objetivo elucidar questões intrínsecas da vida, desde os processos envolvidos no surgimento, sua distribuição pela superfície do planeta, os processos evolutivos e, consequentemente, a habitabilidade das formas de vida extremofílicas na Terra habitarem ambientes extremos, onde os limites físicos e químicos são letais para a maior parte da organismos mesofílicos (RODRIGUES et al., 2012). Neste contexto, a astrobiologia tem um escopo vasto, proporcionando uma ampla compreensão de quais os corpos do Sistema Solar e além, têm ambientes capazes de sustentar processos biológicos. E, portanto, esses estudos são importantes para o entendimento da diversidade e do funcionamento da vida na Terra, auxiliando no desenvolvimento de simulações espaciais e planetárias para a procura de vida extraterrestre.

A vida presente nos ambientes extremos da Terra são relevantes para os estudos astrobiológicos em geral e, em particular, para a busca de vida em Marte. Apesar das condições marcianas serem desfavoráveis, ou seja, na superfície do planeta há uma alta incidência de radiação ultravioleta e raios cósmicos, ventos solares e temperaturas extremamente baixas. Se tratando das condições do solo marciano, há uma baixa disponibilidade de água líquida e uma alta incidência de sais de sulfato e perclorato. Essas são algumas das condições marcianas inóspitas similares as encontradas em alguns ambientes extremos na Terra, como a Antártica ou o alto das montanhas que além de serem ambientes frios, com baixa disponibilidade de matéria orgânica, possuem uma alta incidência de radiação solar UV-A e UV-B.

Os ambientes com extremos de salinidade, por exemplo, são representados por microrganismos denominados halófilos. Isto é, aqueles que dependem de grandes concentrações de sal para o crescimento. Dentre eles, o microrganismo *Halobacterium salinarum* modelo do domínio *Archaea*, é um dos poucos microrganismos capazes de sobreviver em condições saturadas de sal (MADERN; EBEL; ZACCAI, 2000). Trata-se de um notável modelo para o entendimento do funcionamento de adaptações fisiológicas e metabólicas. *Halobacterium salinarum* pode ser considerado um microrganismo poliextremófilo, isso significa que a espécia tolera diferentes parâmetros extremofílicos além da alta tolerância a vários tipos de sais, principalmente NaCl. Isso demonstra a versatilidade da espécie para diferentes parâmetros físico-químicos análogos ao ambiente marciano. Por esta razão, é um microrganismo modelo promissor para as pesquisas astrobiológicas em Marte (FENDRIHAN; MUSSO; STAN-LOTTER, 2009; DASSARMA et al., 2016).

Para identificar organismos na Terra capazes de tolerar os altos níveis de sais presentes em Marte, selecionamos a arqueia halófila *Halobacterium salinarum*, cepa NRC-1, como modelo para entender a habitabilidade do ambiente marciano. Especificamente, buscou-se estudar a capacidade de crescimento com sais de sulfato de magnésio e perclorato de magnésio e sódio. Ainda, a sobrevivência aos efeitos dos sais em combinação com à radiação UV-C, com intuito de compreender os efeitos deletérios dos fatores físicos e químicos na resistência de *H. salinarum* NRC-1. Além disso, compreender os processos envolvidos na degradação de biomoléculas após exposição aos fatores ambientais simulados utilizando espectroscopia Raman e absorção UV-Vis.

1.1 Objetivos

a) Cultivo de Halobacterium salinarum NRC-1;

b) Realização da curva de crescimento de *H. salinarum* NRC-1 em diferentes concentrações de sulfato de magnésio e percloratos de $Mg(ClO_4)_2$ e (NaClO₄), com intuito de averiguar a capacidade de tolerância da cepa estudada;

b) Estudar a interação dos sais de sulfato e perclorato com à radiação UV-C: essencial para mensurar a sobrevivência de *H. salinarum* NRC-1;

c) Preparação de pó de *H. salinarum* NRC-1 em pastilha com pó de diamante, para uso nos experimentos;

d) Realização das simulações ambientais;

e) Detecção das respostas espectroscópicas na degradação de biomoléculas, para uso como bioassinatura.

2 Revisão de Literatura

2.1 Vida em ambientes inóspitos e microrganismos extremófilos

As estratégias de sobrevivência dos seres vivos nos mais diversificados ambientes inóspitos na Terra, remontam a própria plasticidade da vida. O entendimento dos limites da vida nesses ambientes têm aprimorado os esforços para a procura de vida fora da Terra. À vista disso, a própria complexidade e o poder de adaptações fisiológicas para a sobreviver em condições extremas são importantes fatores para os modelos de vida extraterrestre (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001).

Os ambientes extremos na Terra, em geral, apresentam fatores limitantes para a sobrevivência, e desta forma, podem selecionar organismos que toleram ou dependem dessas condições. Estes organismos são chamados de extremófilos (alguns exemplos de classificação dos extremófilos podem ser vistos na Tabela 1), estes são importantes exemplos para o entendimento de ambientes com extremos de parâmetros físicos e químicos, tais como: com extremos de temperatura, com temperaturas extremamente altas, como as fontes hidrotermais ou ambientes com baixíssimas temperaturas, como o alto das montanhas, o fundo dos oceanos e o ambiente Antártico que além de extremos de temperatura, possui alta incidência de radiação e baixa disponibilidade de nutrientes.

Parâmetro	Extremófilo	Limites de crescimento	Exemplos
	Hipertermófilo	$> 85 ^{\circ}\mathrm{C}$	Pyrolobus fumarri (113 °C)
Tomporatura	Termófilo	$45^{\circ}\mathrm{C}\sim85^{\circ}\mathrm{C}$	Synechoccus lividis
Temperatura	Psicrófilo	$< 15 ^{\circ}\mathrm{C}$	Psychrobacter sp.
	Psicrotrófico	<15 °C (ótimo: 20 °C)	E. antarcticum
лЦ	Acidófilo	pH <5	Cyabadium caldarium $(pH 0)$
	Alcalinófilo	pH >8	Bacillus firmus
Salinidada	Ualáfia	$2 \sim 5 \text{ mol}/\text{I}$ (NaCl)	Halobacterium salinarum
Samuade		$2 \sim 3 \text{ mor/L} (\text{NaCI})$	(Archaea)
Pressão	Piezofílico	>400 atm	Shewanella oneidensis
Dessecação	Xerófilo	aw <0.8	Trichosporonoides nigrescens
Radiação	Radiotolerante	Até 60 Gy/hora	Deinococcus radiodurans
Orrigânio	Anaeróbico	Sem oxigênio	Methanococcus jannaschii
Oxigenio	Microaerófilo	Níveis baixos de oxigênio	Clostridium sp.
Nutriontos	Oligotrófico	Crescimento em habitats	Nitrogonymilyg (Archage)
inutilentes	Ultraoligotrófico	depletados de nutrientes	Archaea)

Tabela 1 – Exemplo dos parâmetros físicos e químicos que definem os organismos extremófilos.

Adaptado de Pereira (2015), Rothschild e Mancinelli (2001) e Duarte et al. (2012)

Outros exemplos são os ambientes com valores extremos de pH, com elevada acidez como o Rio Tinto (pH \approx 2) (JOHNSON, 1998), e em contrapartida, ambientes extremamente alcalinos, como o Lago Mono (pH \approx 10) (HORIKOSHI, 2016). Além destes, os ambientes hipersalinos, como as salinas e lagunas com concentração de sais superior a água do mar, são habitats restringidos pela presença de organismos adaptados para tais condições. Estes são alguns dos exemplos de ambientes extremos na Terra análogos aos extraterrestres, como por exemplo, o ambiente marciano e as luas geladas do Sistema Solar (HORIKOSHI; BULL, 2011; CAVICCHIOLI, 2002; RAMPELOTTO, 2010).

2.2 Adaptações à vida em alta salinidade

As adaptações de membranas celulares de microrganismos para sobreviver em altas concentrações de sal, foram desenvolvidas sob efeito da concentração de sódio no crescimento a partir de diferentes tolerâncias ou necessidades de sal (TENCHOV et al., 2006). Alguns exemplos de microrganismos em relação salinidade tolerada, podem ser vistos na Figura 2. De acordo com a classificação, microrganismos halotolerantes podem crescer em concentrações de sal de 1 - 6%, os halófilos de 6 - 15% e halófilos extremos de 15 - 30% (BROCK et al., 2010).





Fonte: Michael et al. (2003)

Os desafios impostos em microrganismos halófilos no ambiente natural são principalmente relacionados à alta desidratação e ao estresse osmótico (MADERN; EBEL; ZACCAI, 2000) (SHIVANAND; MUGERAYA, 2011). Halófilos extremos adaptaram-se para prosperar em ambientes hipersalinos, por meio de proteínas permanentemente expostas à baixa atividade de água e com condições iônicas extremas. As proteínas de halófilos extremos têm capacidades para contrabalancear a pressão osmótica externa produzida pela alta concentração de sal, devido ao acúmulo intracelular de KCl (cloreto de potássio) (VAUCLARE et al., 2015). Desta forma, as adaptações bioquímicas das proteínas de halófilos extremos são adaptadas para suportar o alto teor de sal, assim como, influenciar diretamente em mecanismos de resistência a diferentes efeitos deletérios encontrados nos ambientes hipersalinos (CAPES; DASSARMA; DASSARMA, 2012).

Para os halófilos extremos, a alta concentração de NaCl e sais de magnésio são importantes para o crescimento e manutenção da estrutura celular. Uma vez que, a concentração de NaCl é reduzida a 2 mol/L ou inferior, ocorre a lise celular¹ (FALB et al., 2008). A célula mantém uma concentração de K^+ intracelular alta ($\approx 4 \text{ mol/L}$) que é equivalente à concentração de Na^+ , que por sua vez, desempenham um importante papel na manutenção do equilíbrio osmótico (BROCK et al., 2010; NG et al., 2000). O bombeamento de K^+ do meio externo para o citoplasma atua na estabilização de proteínas e do ribossomo. Em organismo não halofílico por não ter as exigências de K^+ para a estabilização do ribossomo, pode ocorrer a agregação de proteínas, precipitação e desnaturação em condições de elevada salinidade (OREN, 2002b; KLEIN et al., 2005).

2.3 Halobacterium salinarum NRC-1

Halobacterium salinarum é uma arqueia halófila extrema, geralmente denominada como haloarchaea, é conhecida principalmente por habitar em ambientes hipersalinos com concentrações de cloreto de sódio próximas à saturação. De modo genérico, é uma das poucas espécies que consegue sobreviver nessas condições. É um microrganismo bioenergeticamente flexível, por ter diferentes modos de produção de energia, como a conversão de energia luminosa em energia química via bomba de prótons através da proteína bacteriorodopsina (BR), que consiste em uma estrutura não clorofílica que se assemelha a fotossíntese. Outros mecanismos adquiridos na produção de energia estão relacionados ao processo de respiração, a fermentação de arginina (utilizando o acúmulo de metabólitos presentes no ambiente) e o armazenamento de energia (que se assemelha a uma bateria) via gradiente de potássio (GONZALEZ et al., 2009).

As *Haloarchaea* em geral, podem ter os nutrientes escassos por um longo período de tempo em habitat natural. À vista disso, *Halobacterium salinarum* NRC-1 dispõe de adaptações para diferentes mecanismos geradores de energia para crescer o máximo possível quando as condições se tornam favoráveis. Os processos de produção de energia podem ocorrer de maneira simultânea, o que pode proporcionar um crescimento exacerbado da espécie dependendo do ambiente (TALAUE et al., 2016; NAYEK et al., 2014).

Halobacterium salinarum, mostrada na Figura 3, pode crescer tanto na presença de

¹ Processo de destruição ou dissolução da célula causada pela rotura da membrana plasmática.

luz, quanto na ausência. Condições anaeróbicas e presença de luz são essenciais para a produção de carotenoide (pigmento que atua na proteção contra processos foto-oxidativos). Uma das características mais marcantes em *H. salinarum* é sobreviver utilizando somente a luz como fonte de energia para a célula. Na ausência de luz, a síntese de arginina é a principal responsável pela maior parte da energia celular (VÍTEK, 2010; MIRANDA et al., 2010). Outra característica é a presença de uma vesícula de gás, que atua propiciando a flutuabilidade da célula, além de auxiliar os estímulos na célula em resposta a fatores ambientais externos (PFEIFER et al., 1997).

Figura 3 – Exemplos de *Halobacterium salinarum*: A) Colônias crescendo em placa de ágar com sal saturado. B) Imagem microscópica eletrônica com uma ampliação de 13.500 vezes. C) Crescimento maciço em ambiente hipersalino.



Fonte: Adaptado de (MCGENITY, 2017)

A parede celular de *Halobacterium salinarum* é constituída por uma única membrana de bicamada lipídica circundada por uma camada S, que é formada a partir de proteínas e glicoproteínas para atuar na superfície da célula (NG et al., 2000). A camada S é a camada mais externa, que proporciona a resistência da parede da célula para evitar lise celular. Outra característica da camada S, é atuar como uma barreira seletiva, agregando um reforço estrutural na retenção de proteínas próximas à superfície celular. A composição e estrutura química da membrana também são adaptadas com a presença de aminoácidos específicos que predominam na superfície de proteínas halofílicas (LEUKO; ROTHSCHILD; BURNS, 2010). Devido a essas adaptações celulares, a *H. salinarum* acumula altas concentrações de KCl e osmólitos para superar a força iônica.

A espécie *Halobacterium salinarum* possui uma variabilidade genética alta, sendo que, a linhagem selvagem foi isolada de um peixe salgado. Diferentes sequências do genoma de *Halobacterium salinarum* podem variar significativamente, resultando em duas cepas: NRC-1 e R1 (TWELLMEYER et al., 2007). Ambas as cepas NRC-1 e R1 são originárias do mesmo isolado natural e desde então divergiram-se em laboratório (NG et al., 2000; PFEIFFER et al., 2008; TEUFEL et al., 2008). O cromossomo da cepa R1 é praticamente idêntico e completamente colinear com a cepa NRC-1. Em contrapartida, o número e estrutura do plasmídeo são diferentes. A arquitetura do plasmídeo é altamente diferente, e por consequência, produzem uma variação fenotípica entre as cepas (PFEIFFER et al., 2008).

A alta concentração de sais em *Halobacterium salinarum* pode ser usada como escudo, fornecendo proteção contra a radiação ionizante. É um microrganismo modelo em *Archaea* para investigação de danos celulares induzidos por altas doses UV (Kish et al., 2009). Em ambiente natural, a exposição contínua à radiação UV é um dos estresses mais significativos encontrados em microrganismos halófilos. Corroborando para a notável resistência de *H. salinarum* dentre outras *haloarchaea*, quando expostas à radiação de espaço exterior simulado, podem sobreviver e preservar sua integridade genética (LEUKO; RETTBERG, 2017). Este fato foi observado no trabalho de Kish et al. (2009), que analisou como a radiação ionizante pode apresentar uma relação direta com as rupturas na cadeia do DNA das células irradiadas de *Halobacterium salinarum* NRC-1. Outro aspecto demonstrado foi a correlação entre a razão Mn/Fe e a proteção das proteínas contra o estresse oxidativo² (principal lesão da radiação ionizante nas células) similar à bactéria poliextremófila *Deinococcus radiodurans* e outros microrganismos resistentes à radiação ionizante.

Em síntese, a célula de *H. salinarum* confere uma adaptabilidade excepcional, consistindo em diferentes tipos de aparatos funcionais através do conjunto de proteínas de retina presentes na membrana citoplasmática. Estas proteínas auxiliam no funcionamento celular permitindo que o microrganismo consiga se adaptar e prosperar em altas concentrações de sal, com flexibilidade para alternar a respiração entre aeróbia e anaeróbia quando necessário. Através da proteína Bacteriorodopsina (BR), é capaz de realizar a síntese de ATP dirigida pela luz, podendo crescer usando somente a luz como única fonte de energia, ou mesmo através da fermentação de arginina quando não há incidência de luz no ambiente, entre outras variedades de fontes de energia dependendo das condições ambientais. No entanto, para sustentar o crescimento, *H. salinarum* possui mecanismos de flutuabilidade com a presença de vesículas de gás e flagelos que auxiliam na locomoção (através de proteínas de quimiotaxia). Tornando tateável o movimento flagelar para impulsionar à célula para responder as mudanças no crescimento celular em seu extremo e em fatores físico-químicos variados. Além da notória flexibilidade, *H. salinarum* dispõe

² Estresse Oxidativo é definido como um acúmulo de espécies reativas de oxigênio que causam danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componente celulares.

de carotenoides, principalmente a bacterioruberina, que atua na formação de biofilmes cor de rosa em ambientes hipersalinos. Estes, por sua vez, auxiliam na proteção celular em resposta à radiação UV no ambiente natural.

2.3.1 Biomoléculas

Os carotenoides são pigmentos orgânicos encontrados em microrganismos, sobretudo expostos à luz (FENDRIHAN et al., 2006). São envolvidos na produção de energia em *Halobacterium salinarum* auxiliando na dinâmica do seu funcionamento, auxiliando na síntese de ATP dirigida pela luz. Os carotenoides mais importantes são compostos por bacterioruberina e β -caroteno de cianobactérias (MARSHALL et al., 2007) e as diferenças moleculares entres eles podem ser vistas na Figura 4.

Na Halobacterium salinarum, a pigmentação é devido ao elevado teor de carotenoides na membrana com presença de bacterioruberina, molécula com 50 átomos de carbono e derivados, em alguns casos na presença de pigmento de cor púrpura de bacteriorodospina (BR) (LEUKO; ROTHSCHILD; BURNS, 2010). Os carotenoides são responsáveis por reforçar a membrana celular, além de auxiliarem na proteção contra agentes prejudiciais ao DNA (CALEGARI-SANTOS et al., 2016). Estes têm a característica de absorver na região do UV-Vis do espectro eletromagnético e são biomarcadores ativos na espectroscopia Raman (MALHERBE et al., 2017). Para proteger a célula da radiação e outros efeitos deletérios, considera-se uma vantagem para *H. salinarum* sintetizar carotenoides como respectivas moléculas protetoras, especialmente a bacterioruberina. (FENDRIHAN; MUSSO; STAN-LOTTER, 2009; MIRANDA et al., 2010).

Figura 4 – Comparação das estruturas moleculares de β -caroteno e bacterioruberina.



Fonte: Adaptado de Marshall et al. (2007).

A conversão de energia luminosa em energia química para a célula é possível em condições de baixa aeração (a limitação de oxigênio é o que impulsiona a síntese de

bacteriorodopsina), quando a disponibilidade de nutrientes não é favorável em condições ambientais. (OESTERHELT, 1998; OREN, 2002b; BROCK et al., 2010).

A bacteriorodopsina é uma proteína de *H. salinarum*, conjugada há uma molécula de retinal, é capaz de absorver energia luminosa e converter em energia química, via bomba de prótons através da membrana citoplasmática. É capaz de absorver a luz verde, com absorção máxima em 570 nm (BROCK et al., 2010; DUMMER et al., 2011).

Quando a bacteriorodopsina é excitada com a luz resulta um modo adicional de formação de ATP intracelular, complementando a respiração celular com base na transferência de elétrons de cadeia do citocromo (OREN, 2002b; STOECKENIUS; LOZIER; BOGOMOLNI, 1979). Este fator cria um cenário capaz de suprir a energia para a manutenção do metabolismo da célula quando as condições são desfavoráveis por meio de fotociclos, que resultam em uma série de mudanças estruturais da bacteriorodopsina em resposta à luz, mesmo em temperaturas acima de 65 °C (BIRGE, 1990).

A membrana púrpura de *Halobacterium salinarum* possui uma composição química com 25% de lipídios e 75% de proteínas (WHITMIRE et al., 2003). É composta principalmente pela proteína bacteriorodopsina, que compreende as sete hélices transmembranares, cercada por lipídios nativos e moléculas de água.

Além da bacteriorodopsina, existem pelo menos outras três rodopsinas presentes na membrana roxa de *Halobacterium salinarum*. São elas: Halorodopsina, rodopsina sensorial I e II, vistas na Figura 5. A halorodopsina é uma proteína homóloga à bacteriorodopsina, ambas compartilham uma via comum de transporte (ESSEN, 2002). A halorodopsina tem todas as propriedades semelhantes relacionadas a bacteriorodopsina, podendo sofrer um fotociclo complexo quando excitada pela luz (OREN, 2002b).





Fonte: Adaptado de biochem.mpg

A Halorodopsina (HR) corresponde a uma bomba mediada pela luz que bombeia o cloro, absorvendo a luz verde/amarela em 578 nm (SCHOBERT; LANYI, 1982). Sendo importante para manter o equilíbrio osmótico atuando como um ânion para o K^+ , em um processo importante para o crescimento celular de *Halobacterium salinarum* (OREN, 2002b; BIRGE, 1990; CHEN et al., 2016).

As rodopsinas sensoriais I e II (SRI e SRII) também presentes, são receptores para fototaxia auxiliando o movimento da rotação flagelar, permitindo a locomoção das células de *Halobacterium salinarum* NRC-1 em direção à luz (SCHOBERT; LANYI, 1982; BROCK et al., 2010). A rodopsina sensorial I interage tanto com bacteriorodopsina quanto com halorodopsina, permitindo que a célula de *Halobacterium salinarum* NRC-1 se locomova para a escuridão, uma vez que, há a disponibilidade de alta aeração e nutrientes abundantes. A rodopsina sensorial I possui um receptor de luz verde, para a qual as células são atraídas (OREN, 2002b).

A rodopsina sensorial II auxilia no movimento flagelar desencadeando respostas à absorção de luz laranja (MIRONOVA et al., 2005; PECK; JOHNSON; KREBS, 2002), ocasionando uma dinâmica celular amplamente flexível a condições ambientais no citoplasma da célula de *Halobacterium salinarum*. Devido a esta flexibilidade, há a influência na movimentação flagelar por meio de receptores das rodopsinas sensoriais I e II (MI-RONOVA et al., 2005). São semelhantes estruturalmente com bacteriorodopsina e halorodopsina, mas ambas não contribuem para à pigmentação pelos carotenoides das células (OREN, 2002b).

As proteínas de halófilos, em geral, enfrentam grandes desafios bioquímicos para se manterem ativas, estáveis e solúveis em alto teor de sal dentro da célula (OREN, 2002b). Contudo, as proteínas são exclusivamente dependentes de adaptações de toda a maquinaria enzimática celular. São adaptadas para funcionarem em altas concentrações de sal, tornando a célula estritamente dependente da alta salinidade para a manutenção estrutural de proteínas e, consequentemente, sua viabilidade (LANYI, 1979; OREN, 2002b; MADERN; EBEL; ZACCAI, 2000).

2.4 Ambientes hipersalinos

A salinidade dos ambientes hipersalinos é cerca de 10 vezes maior que a água do mar. As concentrações de sais podem variar dependendo da região, em algumas regiões podem ser próximas da saturação cerca de 32%, sendo NaCl o principal sal. Os ambientes hipersalinos estão distribuídos em todos os continentes da Terra, principalmente em regiões áridas, semiáridas e sub-úmidas (VENTOSA; OREN; MA, 2011). O Mar Morto, por exemplo, possui concentrações de magnésio que excedem as concentrações de sódio (SAGASTUME et al.,). O Lago Mono é hipersalino, alcalino e rico em arsênico (BLUM et al., 1998). Alguns exemplos de ambientes hipersalinos naturais podem ser vistos na Figura 6, com exceção dos lago profundos da Antártica. Segundo a definição de Hammer (1983), os lagos salinos são formados sem conexão com o oceano em tempos geológicos recentes, ou a partir da evaporação de inundações de águas marinhas (TUNDISI; TUNDISI, 2016). Os lagos salinos podem ser formados a partir do acúmulo de água marinha em bacias endorreicas³ ou devido ao acúmulo de sais em regiões com evaporação excessiva que excede a precipitação. (JAVOR, 2012).

Figura 6 – Exemplos de ambientes salinos e hipersalinos



(a) Laguna Hutt

- (b) Mar Morto
- (c) Lago mono

A diversidade da vida em ambientes hipersalinos mostra que a hipersalinidade não é, por si só, um fator limitante a organismos adaptados. Por esta razão, estes ambientes são restritivos há microrganismos halófilos, constituídos por bactérias, arqueias e um número considerável de vírus. São quase desprovidos de eucariotos, com exceção da microalga *Dunaliella salina* (ATANASOVA et al., 2012; OREN, 2002a). Os efeitos da alta salinidade fazem com que as atividades de água seja baixa, além de causar a desnaturação de proteínas e a alteração da pressão osmótica. Em organismos não adaptados, esses efeitos ocasionam a lise celular (SALLOTO et al., 2012; PONTEFRACT et al., 2017).

Os ambientes hipersalinos na Terra são importantes modelos análogos a salmouras marcianas. O estudo de Oren, Bardavid e Mana (2014) mostrou que células de *haloarchaea* podem crescer em até 0,6 M de sais de perclorato de $Mg(ClO_4)_2$ e (NaClO₄). Este fato apoia a hipótese de que a vida halofílica pode ter a possibilidade de resistir a presença de percloratos em ambientes de salmoura marciana (COATES; ACHENBACH, 2004; MOTZER, 2001). Dentro deste contexto, os halófilos são os principais modelos para o entendimento de mecanismos de resistência à radiação, além de dessecação e alto vácuo em condição marciana (CAPES; DASSARMA; DASSARMA, 2012; KOTTEMANN et al., 2005).

2.5 Perspectivas Astrobiológicas em Marte

Marte é um planeta rochoso, frio (com temperatura média de -55 °C), seco e empoeirado. A atmosfera marciana é oxidante, predominantemente através da fotoquímica

³ Bacias endorreicas são formadas quando as águas não possuem saídas superficialmente para o mar ou rios.

de CO_2 e H₂O (SHOLES et al., 2017). A quantidade de gases presentes atualmente detectados na atmosfera marciana são constituídos por 95% de CO_2 , menos de 3% de N₂ e menos de 2% de Ar, além de traços de água, oxigênio e metano (OWEN et al., 1977; SEINFELD; PANDIS, 2016).

Além do mais, a atmosfera marciana é relativamente fina e o planeta não possui campo magnético ativo para protegê-lo. Por esta razão, há uma alta incidência de radiação ultravioleta, raios cósmicos e vento solar que, eventualmente, penetram na superfície árida de coloração avermelhada (MOLINA-CUBEROS et al., 2001; HOLMSTRÖM; BA-RABASH; KALLIO, 2001). A coloração avermelhada se dá em virtude da presença de óxido de ferro (HUNTEN, 1979), que predomina na superfície do planeta, juntamente com sais de cloreto distribuídos em escala global (OSTERLOO et al., 2008).

O verão marciano com temperatura de -20 °C nos polos e 20 °C na região equatorial propicia a existência de água nos fluxos de salmouras, devido a presença de quantidades significativas de sais de perclorato e, principalmente, o perclorato de magnésio Mg(ClO₄)₂, que atua diminuindo o ponto de congelamento da água (OJHA et al., 2015; LENTON et al., 2017). As várias missões espaciais à Marte constataram a presença de outros sais de perclorato, como o perclorato de sódio (NaClO₄) e perclorato de cálcio Ca(ClO₄)₂. Os percloratos podem ser oxidantes em temperaturas acima de 100 °C, mas, no ambiente marciano eles se encontram estáveis devido às baixas temperaturas (CHEVRIER; HANLEY; ALTHEIDE, 2009; NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2010; KOUNAVES et al., 2014).

Os dados atuais sugerem a existência de percloratos em toda a superfície marciana, as análises realizadas pelo Espectrômetro Compacto de Reconhecimento de imagens (CRISM, na sigla em inglês), um dos instrumentos levados pela sonda Mars Reconnaissance Orbiter da Nasa, mostraram a presença de diferentes tipos de percloratos em diversas crateras (HECHT et al., 2009; BEBLO-VRANESEVIC; HUBER; RETTBERG, 2017). As crateras Polikir e Hale (NaClO₄ e Mg(ClO₄)₂) (OJHA et al., 2015), Horowitz (NaClO₄) (OJHA et al., 2015) e Gale (Ca(ClO₄)₂) (GLAVIN et al., 2013). Além da detecção de percloratos em crateras marcianas, outros sais como MgSO₄ e CaSO₄ foram detectados pelo instrumento Athena no rover Spirit nos solos da cratera Gusev (HASKIN et al., 2005; GENDRIN et al., 2005) e MgSO₄ na cratera Eagle (ROACH et al., 2009).

O solo marciano é composto por oxidantes, óxidos de ferro e sais de perclorato e sulfato, que podem ser letais em combinação com a radiação ultravioleta. A abundância de percloratos distribuídos globalmente em Marte varia entre 0,4 a 0,6% (MATSUBARA et al., 2017), esses sais têm a propriedade de absorver umidade do ambiente e tornarem-se naturalmente hidratados. Devido às baixas temperaturas, os sais de perclorato ao entrarem em contato com o gelo do solo podem formar salmouras (FISCHER et al., 2014; CARRIER; KOUNAVES, 2015). A explicação para a existência de percloratos em Marte proposta pelos autores Schuttlefield et al. (2011) e Kim et al. (2013) são referentes aos mineiras da superfície que podem catalisar a oxidação fotoquímica de cloretos em percloratos. Outro fator importante, são os múltiplos estados de hidratação do MgSO₄ detectados em Marte, que podem auxiliar nos processos aquosos com condições severamente ácidas do solo (ROACH et al., 2009). Devido a isso, os percloratos e sulfatos atuam como indicativo da presença de água salobra ainda existente.

Marte tornou-se frio e seco após perder sua atmosfera devido a pulverização induzida por vento solar e pelos processos fotoquímicos, que foram capazes de remover os gases presentes (JAKOSKY et al., 1994). Por consequência da perda de componentes atmosféricos de Marte, ocorreu a perda da água, que resultou na formação de bolsas de salmouras em ambientes de permafrost (solo permanentemente congelado). No entanto, essas bolsas de salmouras secaram e formaram os evaporitos, que são depósitos resultantes da evaporação de água salina (MANCINELLI et al., 2004). Um exemplo é a região de Meridiani Planum de Marte, mostrada na Figura 7, situada próxima ao equador de Marte, que apresenta depósitos extensos de evaporitos, detectados pelos rovers Spirit (TOSCA et al., 2005) e Opportunity (ANDREWS-HANNA; PHILLIPS; ZUBER, 2007).



Figura 7 – Meridiani Planum

Fonte: https://www.nasa.gov/.

Na Terra, o tipo de microrganismo mais provável para sobreviver em salmouras ou evaporitos são as arqueias halófilas. Por serem capazes de sobreviver em cristais de sal, e mais ainda, por terem a capacidade metabolizar mesmo encrustadas em evaporitos (ROTHSCHILD, 1990). O estudo de (MANCINELLI et al., 2004), relacionado ao potencial de microrganismos que podem sobreviver em evaporitos congelados, mostrou que *Halobacterium salinarum* entre outros halófilos podem sobreviver em evaporitos contidos em permafrost. Isso resulta em implicações sobre possibilidade de ambientes marcianos como plausíveis para a existência formas de vida halofílicas. Por isso, estratégias de detecção de microrganismos em ambientes hipersalinos de ocorrência natural, são relevantes para estudos astrobiológicos com implicações para futuras missões à Marte (FENDRIHAN; MUSSO; STAN-LOTTER, 2009; SEPHTON; CARTER, 2015).

A existência de arqueias halófilas viáveis ou suas bioassinaturas em sedimentos atuais ou antigos (milhões de anos) na Terra, reforça a possibilidade de vida microbiana halófila pretérita ter a possibilidade de estar preservada em solo marciano (OREN, 2014). Assim como, a capacidade de crescimento e sobrevivência a ambientes hipersalinos como análogo a Marte para a possibilidade de vida em salmouras marcianas (MICHALSKI et al., 2013).

Uma das perspectivas de futuras missões astrobiológicas in situ no ambiente marciano será a ExoMars, Figura 8. Essa missão será a primeira da Agência Espacial Europeia com caráter específico de procura de vida na subsuperfície marciana, incluindo a capacidade de perfurar a superfície, recuperar amostras. O rover ExoMars será equipado para detectar possíveis sinais, como bioassinaturas, utilizando a espectroscopia Raman entre outras técnicas (EDWARDS et al., 2007).



Figura 8 – Perspectivas de futuras missões astrobiológicas em Marte (a) Schiaparelli. (b) Rover ExoMars 2020. (c) Candidatos para plataforma de pouso.

Fonte: exploration.esa.int/mars.

A espectroscopia Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional que se caracteriza por não ser destrutiva e não necessitar preparo prévio das amostras. As bioassinaturas podem ser produzidas por microrganismos em ambientes subterrâneo e subsolo, através de bio-minerais, fósseis microbianos e compostos orgânicos produzidos por atividade biológica (lipídios e aminoácidos, (HAYS et al., 2017), ou em microtúbulos recorrentes de atividade microbiana (FISK; GIOVANNONI; THORSETH, 1998), e degradação de matéria orgânica ou minerais (GROSS et al., 2017; MICHALSKI et al., 2013). Outra característica da espectroscopia Raman é uma técnica bastante sensível a carotenoides (VÍTEK, 2010), pigmento foto-protetor presente em H. salinarum NRC-1. Neste trabalho, nos concentramos na identificação por Raman de carotenoide como biomarcadores com relevância para a investigação de maneiras de detecção de vida extraterrestre, tendo em vista que a utilização da espectroscopia Raman tem sido promissora para a exploração planetária e aplicações astrobiológicas (ABBEY et al., 2017).

2.6 Técnicas espectroscópicas

2.6.1 Espectroscopia Raman

A técnica Raman utiliza uma fonte monocromática de luz que ao atingir o objeto de interesse é espalhada por ele. O resultado é o espalhamento elástico (dispersão de Rayleigh) ou inelástico (espalhamento Raman) da radiação com a matéria. A radiação interage com os elétrons mais externos da molécula, podendo haver ou não a transferência de energia. A molécula pode ficar em estado excitado vibracionalmente (radiação espalhadora) ou pode estar nesse estado, o que fará com que a radiação espalhadora tenha energia maior que a excedente. Se não houver a transferência de energia, a radiação espalhada terá a mesma energia incidente, o efeito será o espalhamento elástico (dispersão Rayleigh) (MARSHALL; EDWARDS; JEHLICKA, 2010).

A Figura 9, apresenta o esquema geral representando o espectro Raman e os possíveis espalhamentos Anti-Stokes, Rayleigh e Stokes. A espectroscopia vibracional de amostras biológicas fornece informações da química de compostos celulares, em um efeito que pode ser amplificado quando a energia incidente coincide com a energia de absorção eletrônica (FROSCH et al., 2007).

Figura 9 – Esquema geral representando o espectro Raman e os possíveis espalhamentos Anti-Stokes, Rayleigh e Stokes.



Adaptado de (FARIA; MASSABNI, 2011).

A espectroscopia Raman é um dos métodos promissores para a possibilidade de detecção de bioassinaturas para futuras missões astrobiológicas no Sistema Solar (FEN-DRIHAN; MUSSO; STAN-LOTTER, 2009). A técnica Raman já se mostrou uma excelente ferramenta para a detecção de *Haloarchaea* vivas ou dormentes em cristais de sal (LEUKO; ROTHSCHILD; BURNS, 2010). Assim como, os pigmentos carotenoides são

biomarcadores ativos na espectroscopia Raman (MALHERBE et al., 2017). As assinaturas Raman de carotenoides, especialmente bacterioruberinas, podem ser descritas a partir de biomoléculas de *Halobacterium salinarum* nas regiões das bandas ca. 1152 cm⁻¹, ca. 1505 cm⁻¹ são formadas pelas vibrações em fase C = C (v₁) e alongamento C-C (v₂) da cadeia poliênica em carotenoides. (MARSHALL et al., 2007; JEHLIČKA; EDWARDS; OREN, 2013; DASSARMA, 2006). A origem do pico de ca. 1000 cm⁻¹ é devido ao estiramento assimétrico de (CH₂) e deformação de (CH₃), presentes em proteínas e lipídios (FENDRIHAN; MUSSO; STAN-LOTTER, 2009).

2.6.2 Espectroscopia de absorção óptica UV-Vis

A técnica de espectroscopia na faixa do UV-Vis (ultravioleta - visível, capaz de identificar moléculas por suas transições eletrônicas), com utilização de luz aproximadamente monocromática (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). É aplicada para determinar a presença e concentração de compostos inorgânicos e compostos orgânicos. A espectroscopia de UV-Vis é uma excelente ferramenta para a identificação de grupos funcionais na molécula, determinação de parâmetros físico-químicos, como constantes de equilíbrio e de velocidade de reações.

A determinação quantitativa de compostos contendo absorventes ou cromóforos determinada por espectrofotometria UV-Vis, pode ser feita pela da lei de Beer-Lambert, que define a existência de uma relação exponencial entre a transmissão da luz através de uma substância, com sua espessura (GONZÁLEZ, 1998). A quantidade de luz absorvida é medida pela razão entre a intensidade da radiação incidente I_0 e da radiação transmitida I.

A concentração de substâncias que absorvem a radiação em determinado comprimento de onda pode ser medida de modo quantitativo, usando a lei de Beer-Lambert: $A = \log_{10}(\frac{I}{I_0}) = \epsilon \cdot c \cdot L$, endo A a absorbância medida, I_0 a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra (PERKAMPUS; GRINTER, 1992).

3 Material e Métodos

Neste trabalho, foram realizados experimentos de crescimento e sobrevivência de *Halobacterium salinarum* cepa NRC-1, bem como o estudo de algumas de suas biomoléculas como possíveis bioassinaturas. As condições para o cultivo de todos os experimentos foram com luz constante (para a produção de pigmento), temperatura de 37 °C e meio de cultura CM (NaCl - 250 g/L; MgSO₄ - 20g; KCl - 2 g/L; Citrato de sódio - 3 g/L; Peptona bacteriológica neutralizada - 10 g/L). As culturas foram crescidas em 1 ml de CM líquido em tubos de ensaio (com 15 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro), agitados em 250 rpm com posição inclinada para manter a aeração. Para a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), foram utilizadas placas solidificadas com ágar bacteriológico 15 g/L.

3.1 Experimentos de Crescimento em Meios Salinos

3.1.1 Ensaio de Resistência ao Sulfato de Magnésio

As culturas foram inoculadas com 20 μ l de pré-inóculo de *Halobacterium salinarum* - NRC1 em tubos de ensaio com 2 ml de meio líquido CM adicionados a 1 mol/L e 2 mol/L de MgSO₄, em triplicata para cada concentração. Ambas foram encubadas em condições de 37 °C, sob agitação de 250 rpm e luz constante. Foram usados 12,32 g/L de MgSO₄ para o preparo de soluções 1 mol/L e 24,6 g/L para 2 mol/L de MgSO₄, respectivamente.

A curva de crescimento foi feita analisando a turbidez D.O. $_{600nm}$ continuamente durante 110 horas. Na Figura 10, nota-se o crescimento em ambas as concentrações de MgSO₄ e a pimentação da amostra controle e amostra com 1 mol/L.



Figura 10 – Crescimento com sulfato de magnésio

Fonte: A autora.

3.1.2 Ensaio de Resistência a Sais de Perclorato

As culturas foram inoculadas com 20 μ l de pré-inóculo de *Halobacterium salinarum* - NRC1 em tubos de ensaio com 2 ml de meio líquido CM com concentrações de 0,2, 0,6 e 1 mol/L de sais de perclorato de sódio (NaClO₄) e magnésio (Mg(ClO₄)₂), respectivamente. Os percloratos foram adicionados a 50 ml de meio de cultura líquido CM, em seguida foram homogenizados e filtrados numa peneira (membrana de filtro). Após a filtragem foram retirados 2 ml (em triplicata) de cada concentração de perclorato em meio de cultura. Para adquirir as concentrações pretendidas de NaClO₄ em torno de 1,22 g/L para a obtenção de 0,2 mol/L, 3,67 g/L para a obtenção de 0,6 mol/L e 6,12 g/L para a obtenção de 1,0 mol/L. Para adquirir as concentrações de Mg(ClO₄)₂ foram usados em torno de 1,12 g/L para a obtenção de 0,2 mol/L, 3,35 g/L para obtenção de 0,6 mol/L e 5,58 g/L para obtenção de 1,0 mol/L.

Os cultivos foram encubados em 37 °C, sob agitação de 250 rpm e luz constante. A curva de crescimento foi feita analisando a turbidez D.O. $_{600nm}$, o crescimento e a pigmentação das amostras podem ser vistas nas Figuras 11 e 12. As medidas realizadas foram feitas continuamente durante 110 horas.

Figura 11 – Crescimento $H\!\!.$ salinarum NRC-1 em diferentes concentrações de perclorato de magnésio.



Fonte: A autora.

Figura 12 – Crescimento $H.\ salinarum$ NRC-1 com diferentes concentrações de perclorato de sódio.



Fonte: A autora.

3.2 Experimentos de Sobrevivência à Radiação UV-C

Para a realização dos experimentos de irradiação UV-C, foram utilizadas somente as amostras cultivadas nas concentrações mais baixas de sais que apresentaram pigmentação. A Tabela 2 mostra em detalhe quais as amostras apresentaram pigmentação do experimento de crescimento, 3.1 apresentaram pigmentação, tal característica presente somente em curva de crescimento bifásico.

Tabela 2 – Comportamento da curva de crescimento *Halobacterium salinarum* NRC-1 em meios enriquecidos com diferentes concentrações de sais de sulfato e perclorato.

Amostra	Mol/L	Curva de Crescimento	Características
Controle	х	Bifásico	Pigmentação
$MgSO_4$	1,0	Bifásico	Pigmentação
$MgSO_4$	2,0	Monofásico	X
NaClO ₄	0,2	Bifásico	Pigmentação
NaClO ₄	0,6	Monofásico	X
$NaClO_4$	1,0	Monofásico	X
$Mg(ClO_4)_2$	0,2	Bifásico	Pigmentação
$Mg(ClO_4)_2$	0,6	Monofásico	х
$Mg(ClO_4)_2$	1,0	Monofásico	Х

Fonte: A autora.

O experimento foi feito em triplicata durante a fase exponencial, sempre com D.O. $_{600nm}$ (0.5) dos pré-inóculos que apresentaram pigmentação durante o crescimento com sais de sulfato e perclorato, tais amostras são, o controle (crescimento padrão), MgSO₄ (1,0 mol/L), NaClO₄ (0,2 mol/L) e Mg(ClO₄)₂ (0,2 mol/L), respectivamente. Foram colocados 200 µl de cada inóculo em D.O. (0.5) em meio CM em placa de Petri de vidro de 90 mm, e após isso cada amostra foi exposta a lâmpadas UV-C Phillips (com máxima emissão em 254 nm) e irradiada nas doses de 250 J/cm², 500 J/cm², 750 J/cm² e 1000 J/cm². Para as medidas das doses foi usado um radiômetro Vilber Lourmat RMX-3W.

Após cada dose de irradiação UV-C, foram retiradas alíquotas de 200 μ l e diluídas 1.000X, 10.000X e 100.000X em meio líquido CM e plaqueadas em duplicata nas placas de Petri com meio CM sólido, foram espalhadas com pérolas de vidro 20 μ l dos inóculos irradiados. As amostras foram cultivadas em condições ideais de temperatura para o crescimento, as placas foram colocadas dentro de beckers com água ultrapura, a fim de manter a umidade e prevenir o ressecamento do ágar.

3.3 Condições de Cultivo e Extração de Pigmentos

Foram utilizados pré-inóculos de colônias isoladas cultivadas em meio CM solidificado, as colônias foram repicadas em 6 frascos de erlenmeyer, cada um com 250 ml de
meio liquido CM. Os cultivos foram feitos em duplicata, durante seis dias para a maior produção de pigmentos. As condições para o cultivo de *Halobacterium salinarum* NRC-1 e formação de pigmentos foram com luz constante, em 37 °C e agitação de 250 rpm.

Após o crescimento, as alíquotas foram retiradas dos erlenmeyer e colocadas em tubos Falcon para o processo de centrifugação (6.000 rpm por 15 minutos). Neste caso, para não ocorrer a lise celular, não foi feito o processo de lavagem com água ultrapura para retirada de meio de cultura da amostra com pellet. Entretanto, após a centrifugação, o pellet foi diretamente liofilizado por 15 horas em temperatura ambiente. Desta forma, foram retirados a água e os resquícios do meio de cultura. E, por fim, houve a transformação da célula em pó. A Figura 13 mostra os principais processos para o crescimento e liofilização da *H. salinarum* NRC-1.

Figura 13 – Processos de crescimento, centrifugação e liofilização de *Halobacterium sali*narum NRC-1.



(a) Culturas de Halobacterium salinarum NRC-1 durante o cultivo.



(b) Meio de cultura com Halobacterium salinarum NRC-1 após centrifugado.



(c) Liofilizador utilizado para a formação do pó de NRC-1.

Fonte: A autora.

3.3.1 Preparo de Pastilhas

A amostra controle foi feita com pó de Halobacterium salinarum NRC-1, o peso seco obtido após a maceração foi de 0,1462 g. Foi calculada a proporção em massa do pó de diamante, padrão usado em espectroscopia Raman, cuja massa usada foi de 0,0038 g. O pó de diamante foi misturado com pístilo de ágata com pó de H. salinarum NRC-1 por 15 minutos, no cadinho de ágata. Em seguida, a mistura do pó de diamante com pó de H. salinarum NRC-1 foi pesada para formar as pastilhas: Pastilha A1 (0,023 g) e Pastilha A2 (0.023 g). As pastilhas foram montadas com fita Kapton (filme de poliimida, DuPont) no pastilhador de 6 mm e pressionadas com 2,5 toneladas por 10 segundos.

Foi adicionado uma tira de fita Kapton em uma placa com fita de carbono (própria para microscopia eletrônica e compatível com vácuo), a fim de manter as pastilhas presas na placa. Para obter um maior controle da homogeneidade na mistura dos substratos de Dióxido de silício (SiO_2) e Carbonato de cálcio $(CaCO_3)$, estes foram peneirados e depois macerados individualmente com o pó obtido de H. salinarum NRC-1. O total de 0,1621 g de pó de diamante previamente misturado com pó de NRC-1 foi dividido para formar duas pastilhas com substratos: Pastilha B1 (0,072g de pó de H. salinarum NRC-1 e pó de diamante, foi acrescentado 0,068 g de CaCO₃, com peso final da pastilha B1 de 0,0238 g). Em sequência, a Pastilha B2 feita com (0,086 g de pó de NRC-1 e pó de diamante, foi acrescentado 0.081 g de SiO₂, com peso final da pastilha B2 de 0.0206 g). Para os experimentos, cada pastilha foi feita individualmente, alguns dos processos para a obtenção das mesmas podem ser vista na Figura 14.

Figura 14 – Preparação das misturas e pastilhas.



NRC-1.

(a) Maceração de $H\!\!\!\!$ $salinarum \,$ (b) CaCO_3 sendo peneirado na peneira mesh 10.



(c) Maceração de SiO₂ com pó de NRC-1

Fonte: A autora.

A mistura física foi feita baseada na metodologia desenvolvida por Gallo (2016), referente as proporções ideais para a formação de pastilhas. No experimento, tais proporções de massa utilizadas foram de 3% de pó de diamante, 48,5% de pó de NRC-1 e 48,5%de cada substrato, misturados fisicamente em um almofariz por 10 minutos. As pastilhas podem ser exemplificadas na tabela ??. Esses valores foram escolhidos após testes no Raman de bancada com laser 785 nm, para que a intensidade da banda do diamante fosse similar a das bandas de interesse.

3.3.2 Espectroscopia Raman

Utilizamos pó de diamante sintético (1,6 μ m de tamanho de grão), como padrão interno para Raman, devido as suas ligações carbono-carbono sp3 produzirem uma banda característica 1333 cm⁻¹.

As pastilhas foram irradiadas em um período de 5 minutos (controle) e 30 minutos no Simulador Solar Oriel Sol-UV-2 com uma lâmpada de xenônio operada a uma potência de 1000 Watts.

Após a irradiação, as pastilhas foram caracterizadas pelo espectrofotômetro microRaman de bancada com excitação de 785 nm, Renishaw inVia Raman Microscope, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS/CNPEM. Para os experimentos, cada pastilha foi mapeada a fim de marcar os pontos de carotenoides e obtenção de controle. Foram usadas objetiva de 20x a para realização de 20 acumulações de 1 segundo em 10 pontos para cada pastilha. Na Figura 15, fotos feitas na lupa do LNLS das pastilhas antes da irradiação.



Figura 15 – Fotos feitas em lupa das pastilhas irradiadas.







(c) Pastilha B1



(d) Pastilha B2



Exposição à Radiação UV-C 3.3.3

Para o experimento com radiação UV-C, utilizou-se um sistema com lâmpadas tubulares de mercúrio em baixa pressão Philips TUV-20 W. Estas lâmpadas germicidas, do mesmo tipo que é instalado para limpeza de fluxos laminares, possuem emissão em linha com pico em 254 nm. As análises espectroscópicas foram obtidas por espectroscopia de absorção óptica UV-Vis NanoDrop 2000c. A espectroscopia de absorção na faixa da região do ultravioleta (UV) (200-400 nm) e visível (Vis) (400-800 nm) da amostra, mede a excitação eletrônica das moléculas de interesse, neste caso a absorbância dos picos de carotenoide (MARTINHO, 1994). O carotenoide de Halobacterium salinarum NRC-1 possui três picos no espectro, o pico de máxima absorção do carotenoide é exatamente na região de máxima emissão solar em torno de 500 nm (luz visível) (DAVID; SANTANA, 2008).

Diferentes metodologias, mas essencialmente equivalentes, foram utilizadas com intuito da obtenção de bioassinatura em resposta à radiação UV-C. Duas amostras de *Halobacterium salinarum* NRC-1 ambas com produção de carotenoide, foram utilizadas em dois diferentes experimentos simultâneos, estas são as amostras C e D, o modo como cada uma foi feita será descrito em seguida.

A preparação da amostra C foi feita com o pellet de *H. salinarum* NRC-1, o pellet foi previamente hidratado após a liofilização, isso significa que os sais presentes em na amostra hidrataram-se devido a umidade e temperatura ambiente, o resultado da hidratação adquiriu um aspecto viscoso. A amostra com pellet viscoso foi diluída em 5 ml de água destilada para a obtenção de uma amostra diluída. Este procedimento foi utilizado com intuito de romper as membranas celulares a fim de expor as biomoléculas à radiação UV-C.

Após o preparo, foram colocados 8.000 μ l da amostra C em placa de Petri de vidro com 7 cm de diâmetro. A placa foi exposta à radiação UV-C num período de até 100 minutos no total (retiradas alíquotas de 20 em 20 minutos para medir a absorbância no espectrofotômetro UV-Vis *NanoDrop 2000c*.). As doses de irradiação em cada tempo de exposição foram de: 0 minutos (controle), 20 minutos (13.901 J/cm²), 40 minutos (27.935 J/cm²), 60 minutos (42.239 J/cm²), 80 minutos (56.708 J/cm²), 100 minutos (86.226 J/cm²). O procedimento para este experimento pode ser visto na Figura 16.

Figura 16 – Processos de produção de biomassa hidratada, diluição e irradiação.







(a) Amostra de *H. salinarum* (b) Diluição da amostra com NRC-1 liofilizada e hidratada. água destilada.

(c) Irradiação da amostra com UV-C.

Fonte: A autora.

Para a preparação da amostra D, foram utilizados 30 g de pó de *H. salinarum* NRC-1, centrifugado duas vezes com metanol para a retirada do pellet (apresentou um precipitado de cor esbranquiçada). Para o experimento, o sobrenadante resultante da amostra (aspecto líquido de cor alaranjada) foi colocado em um mini sistema com fluxo de aeração sob a superfície do becker, a fim de obter com mais rapidez a evaporação do metanol presente no sobrenadante. Após a evaporação do metanol, a amostra grudouse nas laterais e fundo do becker. Em seguida, a amostra foi ressuspendida com água

destilada. O procedimento pode ser visto na Figura 17.

Após o preparo da amostra D, foram colocados 8.000 μ l em placa de Petri de vidro com 7 cm de diâmetro (procedimento semelhante a amostra C) para a irradiação ao UV-C. Os tempos de exposição foram os mesmos da amostra C, porém devido a lâmpada germicida ter sido previamente aquecida (durante o experimento com a amostra C), as doses foram relativamente mais altas. Para cada tempo de exposição de 0 minutos (controle), 20 minutos (14.502 J/m²), 40 minutos (28.500 J/m²), 60 minutos (43.301 J/m²), 80 minutos (57.168 J/m²), 100 minutos (71.452 J/m²). Durante cada tempo de 20 em 20 minutos de irradiação, foram retiradas alíquotas para medir a absorbância no espectrofotômetro UV-Vis *NanoDrop 2000c*.

Figura 17 – Processos de evaporação, ressuspensão e irradiação.



(a) Evaporação da amostra com metanol.



(b) Ressuspensão da amostra com água destilada.



(c) Irradiação da amostra com UV-C.

Fonte: A autora.

3.3.4 Simulação da Superfície Marciana

Para a realização do experimento de simulação da superfície marciana, utilizou-se a Câmara de Simulação Planetária e Espacial (AstroCam) do Núcleo de Pesquisa em Astrobiologia (NAP-Astrobio) da Universidade de São Paulo (USP). O experimento foi realizado por meio da centrifugação da amostra líquida de *Halobacterium salinarum* NRC-1 para a separação do meio de cultura. Em seguida, o pellet foi extraído e centrifugado com 200 μ l de metanol e 200 μ l de acetona em um microtubo de 1,5 ml. Foram depositados 20 μ l do sobrenadante resultante da centrifugação sobre fatias de 5x5 mm de wafers de silício cristalino (Si 111) – escolhido por ser um suporte inerte – previamente limpas e desinfetadas, este procedimento foi repetido por 10 vezes para formar o filme sobre as wafers de silício cristalino (Si 111). Após isto, as amostras sobre os suportes de silício foram colocadas no porta-amostra da AstroCam com fita adesiva dupla face de carbono, própria para o vácuo. Estas foram expostas a dose de irradiação UV semelhante ao que se encontra na superfície de Marte, por meio do Simulador Solar Oriel Full Spectrum, com lâmpada de xenônio operada a uma potência de 1.000 Watts, janela de vidro (*fused sílica*, com corte em ca. 200 nm) e fluxo integrado de aproximadamente 623,7 W/m² na região da amostra, Figura 18. Um filtro AM0 (para moldar o espectro solar na câmara) foi utilizado para tornar o espectro mais semelhante ao encontrado na superfície marciana. Antes de ligar o Simulador Solar Oriel Full Spectrum, a AstroCam foi bombeada para remover os gases residuais. Em seguida, a câmara foi bombeada com mistura marciana de 95% de CO_2 e 5% de N_2 referente à composição média da atmosfera de Marte. Durante o experimento foi mantida a pressão 8 mbar e temperatura equilibrada em -55°C com criostato refrigerado com hélio líquido, controlado por resistência.

Figura 18 – Câmara de Simulação Espacial e Planetária (AstroCam) sendo operada durante o experimento.



Fonte: A autora.

Para a realização do experimento, a AstroCAM foi configurada e calibrada referente a metodologia de Patela, Zarneckia e Catlingb (2002), para fornecer temperatura marciana, pressão, composição média atmosférica e fluxos adequados de UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) e UV-C (200-280 nm) da superfície de Marte, Figura 19. A simulação foi feita em 36 minutos, referente a 12 horas em Marte Durante a simulação as fluências usadas foram de UV-A (400-320 nm): 387,8 W/m², UV-B (320-280 nm): 150,0 W/m² e UV-C (280-200 nm): 85,9 W/m². O UV total do simulador solar referente aos

fluxos de UV-A, UV-B e UV-C foi de 623,7 W/m². Para tornar o experimento equivalente ao UV total em Marte de 29,9 W/m², simulamos 36 minutos dentro da AstroCam, devido a alta intensidade do fluxo dentro da câmara, para comparar com o fluxo de radiação no período de 12 horas em Marte. Parte das amostras foram mantidas protegidas por um anteparo de alumínio, não recebendo radiação, porém expostas à vácuo, temperatura e composição química referente a superfície marciana para a obtenção da amostra controle sem radiação (escuro).

Figura 19 – Fluxos medidos com filtro AMO em comparação com as formas espectrais e intensidades do Sol na superfície de Marte e a emitida pelo simulador solar dentro da AstroCam.



Fonte: A autora.

Após a simulação do sobrenadante de *Halobacterium salinarum* NRC-1 em condições marcianas, as wafers de silício cristalino (Si 111) foram colocadas em microtubos de 1,5 ml com 200 μ l de acetona e 200 μ l de metanol para a retirada da amostras. Em seguida, foram medidas as transmitâncias através do espectrofotômetro UV-Vis *NanoDrop* 2000c.

4 Resultados e Discussão

A Seção de Resultados e Discussão será divida para facilitar a organização e compreensão. Na primeira parte, Seção 4.1, serão apresentados os resultados referentes aos experimentos de crescimento de Halobacterium salinarum NRC-1, obtidos por análise espectrofotométrica de Densidade Óptica (D.O. 600nm), com intuito de caracterizar a curva de crescimento com diferentes sais análogos ao ambiente marciano. Na segunda parte, Seção 4.2, serão apresentados os resultados referentes a sobrevivência de H. salinarum NRC-1, com intuito de verificar a viabilidade celular junto aos sais percloratos e sulfato em resposta ao efeito deletério da radiação UV-C. Na terceira parte, Seção 4.3, serão apresentados os resultados referentes aos experimentos de bioassinatura com pastilhas de carotenoide de H. salinarum NRC-1 e substratos de SiO₂ e CaCO₃ análogos ao solo marciano, analisados por espectroscopia Raman, experimentos com carotenoide e sobrenadante de H. salinarum NRC-1 irradiados com UV-C, analisados por espectroscopia de absorção óptica UV-Vis, e experimento com sobrenadante de H. salinarum NRC-1 exposto a câmara de simulação planetária e espacial - AstroCam, com parâmetros físicos como temperatura, pressão e radiação análogos a superfície marciana, a fim de verificar a viabilidade do carotenoide, analisado por espectroscopia de absorção óptica UV-Vis. A Tabela 3, especifica resumidamente a forma experimental com que cada amostra foi operada e as técnicas empregadas para as análises.

Amostras	Ensaio	Análise
$MgSO_4 (1/2 \text{ mol/L})$		
NaClO ₄ $(0,2/0,6/1 \text{ mol/L})$	Curva de Crescimento	Densidade óptica
$Mg(ClO_4)_2 (0,2/0,6/1 mol/L)$		
$MgSO_4 (0,2 \text{ mol/L})$		
$NaClO_4 (0,2 mol/L)$	Irradiação UV-C	Espectroscopia UV-Vis
$Mg(ClO_4)_2 (0,2 \text{ mol/L})$		
Pastilha A1		
Pastilha A2	Simulador Solar	Espectroscopia Raman
Pastilha B1		
Pastilha B2		
Amostra C	Irradiação UV C	Espectroscopia UV Vis
Amostra D	IIIaulação 0 V-C	
Câmara Irradiado		
Câmara Escuro (Controle)	AstroCAM	Espectroscopia UV-Vis
Fora/Escuro (Controle		

Tabela 3 – Especificação experimental e análise técnica de cada amostra.

4.1 Crescimento

O ambiente marciano pode não ser aprazível para organismos mesófilos, devido a presença de sais tóxicos detectados por análises espectroscópicas da superfície marciana (MATSUBARA et al., 2017). A presença estimada de sais de perclorato de sódio é de 0,1225 mol/L e 0,0532 mol/L de perclorato de magnésio, com base em valores estimados de peso e volume descritos pelos autores Wadsworth e Cockell (2017). Para especular a habitabilidade do ambiente marciano, analisou-se os efeitos de sais prevalentes de solos e salmouras de Marte no crescimento da *haloarchaea* poliextremófila *Halobacterium salina-rum* NRC-1, adaptada a crescer em concentrações de até 5 mol/L de NaCl. Verificou-se que *H. salinarum* NRC-1 foi capaz de crescer na presença de luz e aerobiose em condições crescentes de sais de sulfato de magnésio e perclorato de sódio e magnésio em concentração máxima de 1 mol/L.

Em comparação com estudos anteriores, as haloarchaea Halobacterium salinarum NRC-1 e Halorubrum lacusprofundi foram submetidas a concentrações e até 0,4 mol/L de perclorato de sódio e magnésio, em crescimento anaeróbio e ausência de luz. Os autores Laye e DasSarma (2017), identificaram que em condições de anaerobiose somente a H. lacusprofundi utiliza o perclorato como receptor de elétrons. Sendo assim, H. salinarum foi incapaz de crescer na presença de perclorato de sódio e magnésio devido a ausência de luz e privação de oxigênio. Neste estudo, H. salinarum NRC-1 foi submetida a concentrações mais elevadas de sais de sulfato e perclorato sem alteração nas proporções de outros sais presentes no meio de cultura CM. O meio CM é composto por 4,5 mol/L de NaCl e 0,08114 mol/L de sulfato de magnésio entre outros sais em menor quantidade, assim como as condições ideais de temperatura e agitação não foram alteradas.

Inicialmente, caracterizou-se o crescimento de *Halobacterium salinarum* NRC-1 em meio CM como controle dos experimentos. O monitoramento do crescimento de *H.* salinarum NRC-1 foi obtido por mudanças na densidade óptica (D.O. $_{600nm}$) em intervalos de tempos após o inóculo. Para averiguar as características da curva de crescimento, o cultivo em condições padrão (usado como controle) mostrou o típico comportamento bifásico na curva de crescimento de *H. salinarum* NRC-1. Este resultado foi consistente com as observações anteriormente feitas por Shand e Betlach (1991) e Facciotti et al. (2010). Um exemplo da curva de crescimento típica de NRC-1 é mostrada na Figura 20, que exemplifica em detalhe a curva de crescimento bifásico proveniente de uma segunda fase crescimento que, por sua vez, é equivalente a uma divisão celular extra no crescimento de *H. salinarum* NRC-1. Até o momento, a explicação possível para o comportamento da curva de crescimento bifásico de *H. salinarum* NRC-1 descrito por Facciotti et al. (2010), é a dispersão da luz pelo aumento de vesículas de gás provenientes de células lisadas, que podem induzir o aumento do D.O. $_{600nm}$ após o início da fase estacionária. Figura 20 – Curva típica de crescimento de *Halobacterium salinarum* NRC-1 em meio CM, analisada por densidade óptica (D.O. $_{600nm}$) e contagem de células por Unidade de Formação de Colônias (UFC).



Fonte: Adaptado de Facciotti et al. (2010)

Os experimentos com crescimentos em meio CM enriquecidos com sais de sulfato e perclorato, foram feitos simultaneamente. Os cultivos foram encubados em condições padrão para o crescimento de *H. salinarum* NRC-1, com 37 °C, agitação de 250 rpm e luz constante. Nos experimentos cujo dados da análise de turbidez D.O. $_{600nm}$, por um período de 110 horas, foram utilizados para montar as curvas de crescimento. Destes valores obtidos em diferentes repetições para cada experimento (triplicatas, no mínimo), calculouse a média e o desvio padrão das medidas, apresentadas nos gráficos como símbolos com barras de erro.

Os resultados dos experimentos com sulfato de magnésio (MgSO₄) no crescimento de *H. salinarum* NRC-1, mostraram que as concentrações de 1 e 2 mol/L não foram deletérias para a cepa estudada. Tendo em vista a quantidade necessária de 0,08114 mol/L de MgSO₄ no meio de cultura CM, (ver Seção 3), para o crescimento de *H. salinarum* NRC-1 em condição ideal, pode-se observar que além dessa quantidade presente, o enriquecimento do meio CM com mais 1 mol/L de MgSO₄, mostrou que houve diferença significativa no comportamento da curva de crescimento. Observou-se a extensa duração da fase lag (\approx 40 horas), possivelmente devido ao tempo necessário para as células repararem os danos antes de começarem a se dividir. Na fase exponencial em D.O. _{600nm} (0.5), observou-se pigmentação rosada na amostra com 1 mol/L de $MgSO_4$, possivelmente devido a presença de bacterioruberinas.

Nota-se nos resultados obtidos, Figura 21, que *H. salinarum* NRC-1 pode ser cultivada na presença de concentrações mais altas de MgSO₄, além da quantidade necessária para o crescimento. Percebe-se também que houve declínio na curva de crescimento na cultura enriquecida com 2 mol/L de MgSO₄ após D.O. $_{600nm}$ (0.5), possivelmente devido a lise celular ou morte. Os resultados demonstraram que a concentração de 1 mol/L de MgSO₄ não é um fator limitante para o crescimento de *H. salinarum* NRC-1, enquanto o crescimento é inferior em 2 mol/L de MgSO₄, devido a baixa capacidade de sobrevivência. Além disso, observou-se o comportamento monofásico na curva de crescimento e culturas sem pigmentação em MgSO₄ em 2 mol/L.

Figura 21 – Efeito de Sulfato de Magnésio no crescimento de H. salinarum NRC-1.



Fonte: A autora.

Os resultados dos experimentos apresentados nas Figuras 22 e 23 com diferentes concentrações de perclorato de sódio NaClO₄ e perclorato de magnésio Mg(ClO₄)₂ de 0,2, 0,6 e 1 mol/L e mesmos patamares de encubação inferidas ao crescimento de *Halobacterium salinarum* NRC-1. Observou-se o crescimento de *H. salinarum* NRC-1 na presença de 0,2 mol/L de NaClO₄ e Mg(ClO₄)₂, além de apresentar o comportamento típico padrão

na curva de crescimento bifásico. Em ambos os crescimentos com perclorato, as culturas apresentaram pigmentação rosada semelhante a amostra controle (sem perclorato). Em contraste, a concentração de 0,6 mol/L de NaClO₄ apresentou comportamento monofásico na curva de crescimento de *H. salinarum* NRC-1. Entretanto, em comparação com a concentração de 0,6 mol/L de Mg(ClO₄)₂ que apresentou crescimento somente até a fase lag. Assim como, as concentrações de 1 mol/L de ambos os sais de perclorato apresentaram somente a fase lag. É importante ressaltar que as concentrações de 0,6 mol/L e 1 mol/L tanto de NaClO₄, quanto de Mg(ClO₄)₂ não apresentaram pigmentação.

Figura 22 – Ensaio de crescimento *H. salinarum* NRC-1. Gráfico mostra o crescimento em concentrações crescentes de perclorato de sódio em período de 110 horas após a inoculação. Barras de erro indicam o desvio padrão.



Fonte: A autora.

Figura 23 – Ensaio de crescimento *H. salinarum* NRC-1. Gráfico mostra o crescimento em concentrações crescentes de perclorato de magnésio em período de 110 horas após a inoculação. Barras de erro indicam o desvio padrão.



Fonte: A autora.

Na compilação dos gráficos, não foi possível obter as medidas de análise da densidade óptica no período de ≈ 70 horas, devido a saturação dos sais em concentrações de 0.6 e 1 mol/L de NaClO₄ e Mg(ClO₄)₂.

Os resultados obtidos referentes ao crescimento do sais de sulfato e perclorato, necessitam de técnicas mais apuradas, para verificar os danos causados a nível molecular das modificações sofridas pelas células durante a exposição aos sais. Assim como, os processos adaptativos na bioquímica celular para o aprofundamento nos estudos dos mecanismos de resistência de modelos biológicos.

4.2 Sobrevivência

Halobacterium salinarum NRC-1 é um dos poucos microrganismos já identificados do domínio Archaea capaz de tolerar os altos níveis de luz solar em ambiente natural, por esta razão as implicações sobre a resistência à radiação UV-C foram testadas. Vale notar que a radiação UV-C não acomete ao ambiente natural terrestre, pois é completamente absorvida pela camada de ozônio, mas no ambiente marciano essa radiação tem grande influência. Os autores Wadsworth e Cockell (2017), expuseram à radiação UV-C a bactéria *Bacillus subtilis*, conhecida por ser um possível contaminante da exploração robótica em missões espaciais. Estes autores, relacionaram os efeitos dos sais de perclorato, principalmente o perclorato de magnésio irradiado na faixa do UV-C como um agente bactericídio para *B. subtilis*. Em nosso estudo, o tratamento com altas fluências de UV-C para *H. salinarum* NRC-1, não causou nenhum efeito na pigmentação e crescimento. Porém, por falta de uma metodologia quantitativa para mensurar a resistência de *H. salinarum* NRC-1, houve dificuldade em realizar comparações com os resultados obtidos por outros autores.

Pelos dados coletados durante o experimento de crescimento, Seção 4.1, utilizaramse as amostras que apresentaram curva de crescimento bifásico e pigmentação para expor à radiação UV-C. Observou-se nos ensaios de sobrevivência que os sais de sulfato e perclorato não comprometeram a viabilidade celular. Desta forma, identificou-se o crescimento em todas as amostras irradiadas. Desconsidera-se qualquer contaminante nos experimentos, devido ao meio de cultura CM ser extremamente restritivo a *Haloarchaea*.

Como predito na literatura, *H. salinarum* NRC-1 é extremamente resistente aos efeitos nocivos da radiação em diferentes comprimentos de onda, incluindo a emissão de até 200 nm, o que compreende toda a faixa do UV-C e luz visível (LEUKO et al., 2015). Neste experimento, pode-se observar o crescimento da amostra controle exposta à radiação UV-C, mesmo nas doses mais altas de 1000 J/cm². Na Figura 24, observa-se a formação de tapete (devido a condensação da água presente nos sais) na superfície do ágar. Desta forma, mesmo nas maiores diluições não foi possível observar a formação de colônias isoladas. Mesmo com a utilização da técnica de espalhamento com pérolas, não foi possível obter a contagem das colônias. Presumivelmente, é necessário maiores diluições para a obtenção de colônias isoladas para gerar resultados quantitativos.

Figura 24 – Fotos das placas mostrando o crescimento de *H. salinarum* NRC-1, ambas na diluição de 100.000X em meio CM (controle), após a irradiação ao UV-C.





O experimento com 1 mol/L de MgSO₄ em combinação com à radiação UV-C,

apresentou a formação de colônias isoladas na diluição de 100.000X nas doses de 500 a 1000 J/cm², como visto na Figura 25. Percebe-se visualmente nas placas o baixo crescimento. Neste critério, deve-se levar em conta que, além da concentração de 0,08114 mol/L de MgSO₄ presente no meio CM, o mesmo foi enriquecido com mais 1 mol/L de MgSO₄. Mesmo nessas concentrações de alta salinidade à radiação UV-C não capaz de inativar por completo estas células.

Figura 25 – Fotos das placas mostrando o crescimento de H. salinarum NRC-1, ambas na diluição de 100.000X em meio CM enriquecido com 1 mol/L de MgSO₄, após a irradiação ao UV-C.



(a) 0 J/cm^2

- (b) 250 J/cm^2
- (c) 500 J/cm^2

(d) 750 J/cm^2

Fonte: A autora.

Considera-se que o NaClO₄ e Mg(ClO₄)₂ em combinação com à radiação UV-C, não ocasionaram efeitos esterilizantes para as células de *H. salinarum* NRC-1. Isto demonstra que a cepa estudada pode sobreviver contra os diferentes agentes prejudiciais às células de forma simultânea. Pode-se considerar que os sais de perclorato podem atuar como um escudo protetor de *H. salinarun* NRC-1 contra os agentes deletérios da radiação UV-C. O crescimento das amostras irradiadas com perclorato podem ser vistas nas Figuras 26 e 27.

Figura 26 – Fotos das placas mostrando o crescimento de H. salinarum NRC-1, ambas na diluição de 100.000X em meio CM enriquecido com 0,2 mol/L de NaClO₄, após a irradiação ao UV-C.



Fonte: A autora.

(e) 1000 J/cm^2

Figura 27 – Fotos das placas mostrando o crescimento de *H. salinarum* NRC-1, ambas na diluição de 100.000X em meio CM enriquecido com 0.2 mol/L de Mg(ClO₄)₂, após a irradiação ao UV-C.



Fonte: A autora.

O crescimento de *Halobacterium salinarum* NRC-1 em meio ótimo (controle) e o crescimento com sais de sulfato e perclorato combinados com os efeitos do UV-C não foram mensuráveis, possivelmente devido a problemas experimentais relacionados as diluições utilizadas. Para este experimento, as diluições teriam que ser muito maiores para possivelmente ocorrer a formação de colônias isoladas. Visto que, neste estudo, testaramse diferentes diluições e técnicas preliminares, como a técnica de formação de colônia por espalhamento por faixas convencionais - isolamento por estrias. Testou-se também a diluição com meio Basal (Meio CM sem a presença de peptona), que mostrou-se sujeito a ressecamento em condições de encubação. Por esta razão, utilizaram-se as condições mais favoráveis (preliminarmente testadas) para o cultivo, estas foram com a técnica de espalhamento com pérolas e diluição no próprio meio líquido CM.

Como descrito na literatura por McCready e Marcello (2003), a *H. salinarum* NRC-1 dispõe de carotenoides como mecanismo de proteção ao UV, assim como genes homólogos que auxiliam as estratégias de resistência e o reparo de danos celulares. O comprimento de onda de radiação usado no experimento foi de 254 nm, na faixa do UV-C, a região mais prejudicial do espectro de radiação do UV para o DNA. Neste ínterim, pode-se considerar diferentes mecanismos de proteção de *H. salinarum* NRC-1 contra à radiação UV-C.

4.3 Bioassinatura

4.3.1 Espectroscopia Raman

Para verificar a aplicabilidade da espectroscopia Raman como uma alternativa para a detecção de carotenoides com alguns dos substratos referentes a composição do solo marciano, o experimento foi feito com pó de *H. salinarum* NRC-1 fixada em substratos de SiO_2 e CaCO₃ na forma de pastilhas, das quais foram expostas à luz ultravioleta através simulador Solar SOL- UV do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPEM) durante 5 minutos (controle) e 30 minutos. As medidas no Raman foram feitas em 10 espectros de cada pastilha irradiada, com a linha base de cada pastilha subtraída e normalizada pela intensidade da banda do pó de diamante.

Devido a não homogeneidade das pastilhas, escolhemos os pontos mais rosados de cada uma para fazer as medidas. A média da intensidade das bandas do carotenoide em ca. 1000 cm⁻¹, ca. 1150 cm⁻¹, ca. 1154 cm⁻¹ e ca. 1513 cm⁻¹ foi normalizada pela média da intensidade da banda do pó de diamante em ca. 1333 cm⁻¹. Para análise de degradação da biomolécula, suas bandas foram comparadas com cada pastilha devido a calibração interna que permitiu a comparação das intensidades das bandas do carotenoide em relação a banda do pó de diamante.

A Figura 28 mostra o espectro das pastilhas não irradiadas, com as bandas de bacterioruberina e bacteriorodopsina ca. 1000 cm⁻¹ específicas do carotenoide ca. 1152 cm⁻¹, ca. 1505 cm⁻¹ e a banda do pó de diamante em ca. 1333 cm⁻¹ da amostra controle. ca. 1100 cm⁻¹.

Figura 28 – Espectro de absorção Raman obtidos das pastilhas não irradiadas.



Fonte: A autora.

As Figuras 29 e 30 mostram os espectros para as pastilhas puras (controle) irradiadas no Simulador com 5 minutos e 30 minutos. Como pode ser visto nos espectros, mesmo no menor tempo os picos de carotenoide deixaram de ser detectáveis, devido ao aumento do fundo de fluorescência de *H. salinarum* NRC-1 ter aumentado de intensidade na espectroscopia Raman. Por esta razão, o fundo de fluorescência mascarou as bandas de carotenoide no espectro, impossibilitando a visualização da degradação dos picos do carotenoide em 5 e 30 minutos.

Figura 29 – Espectro de absorção Raman obtidos da pastilha de *H. salinarum* NRC-1 pura (controle), irradiada com simulador solar UV ambiental por 5 minutos de exposição.



Fonte: A autora.

Figura 30 – Espectro de absorção Raman obtidos da pastilha de H. salinarum NRC-1 pura, irradiada com simulador solar UV ambiental por 30 minutos de exposição.



Fonte: A autora.

Para simular a preservação do carotenoide de *Halobacterium salinarum* NRC-1 em substrato com pó de diamante e SiO₂, irradiamos a amostra no simulador solar UV ambiental por um período de 30 minutos. Obtivemos a medida realizada com espectrômetro microRaman de bancada com laser em 785 nm. As intensidades das bandas ca. 1000 cm⁻¹, ca. 1152 cm⁻¹ e 1505 cm⁻¹, respectivas do carotenoide, pois estas podem ter sido mascaradas devido o fundo de fluorescência de *H. salinarum* NRC-1, ou a outra hipótese é que as bandas do carotenoide foram totalmente degradadas durante o tempo de exposição da pastilha (B1), restando somente o pico do diamante, Figura 31. A mesma hipótese pode ser implementada para a pastilha com substrato $CaCO_3$ (B2). Na compilação do gráfico, visto na Figura 32, o espectro mostra que não foi possível identificar a degradação das biomoléculas, devido longo tempo de exposição ao UV ou ao fundo de fluorescência de *H. salinarum* NRC-1.

Figura 31 – Espectro de absorção Raman obtidos da pastilha (B1) da mistura de H. salinarum NRC-1, pó de diamante e SiO₂, irradiada pelo simulador solar UV ambiental por 30 minutos de exposição.



Fonte: A autora.

Figura 32 – Espectro de absorção Raman obtidos da mistura de H. salinarum NRC-1, pó de diamante e CaCO₃ (B2), irradiada pelo simulador solar UV ambiental por 30 minutos de exposição.



Fonte: A autora.

Neste experimento, as irradiações em períodos mais curtos com o Simulador Solar, podem ser uma alternativa para mensurar o decaimento dos picos do carotenoide em relação ao pico do diamante.

4.3.2 Espectroscopia de absorção óptica UV-Vis

Duas diferentes metodologias foram utilizadas neste experimento com intuito de obtenção de bioassinaturas. Por um lado, a irradiação com UV-C nas amostras C e D, servem como comparativos dos espectros a fim de identificar diferenças significativas nos picos do carotenoide de *H. salinarum* NRC-1. Por outro lado, a amostra C sofreu lise celular, o que pode expor diretamente as biomoléculas à radiação UV-C, quanto que na amostra D foi retirado o pellet contendo principalmente o material genético e partículas maiores e mais densas, utilizando somente o sobrenadante composto principalmente por proteínas, moléculas mais leves, partículas dissolvidas e íons. A célula de *Halobacterium salinarum* NRC-1 pode ser facilmente lisada em meio hipotônico, como feita no experimento, permitindo o ensaio com as biomoléculas em solução.

A Figura 33, apresenta o espectro de absorção UV-Vis obtidos da amostras C. Na amostra C, a partir dos 60 minutos de irradiaçãos os picos do carotenoide somem. Além disso, apresentou-se também uma crescente absorção do espectro.



Figura 33 – Espectros de absorção obtidos pelo UV-Vis da amostra C.

Fonte: A autora.

Na compilação do gráfico da amostra D, Figura 34, é possível observar o ligeiro decaimento dos picos do carotenoide, mostrando uma diminuição abrupta após os 40 minutos de irradiação. Em 60 minutos de irradiação pode-se observar uma crescente absorção no espectro, mesmo sem os picos do carotenoide. Possivelmente essa característica foi causada por haver somente biomoléculas sendo expostas à radiação, uma vez que, a membrana e o material genético foram preliminarmente retirados com metanol antes da irradiação.



Figura 34 – Espectros de absorção obtidos pelo UV-Vis da amostra D.

Fonte: A autora.

Na comparação dos gráficos da amostra C e amostra D, pode-se observar a tendência do decaimento dos picos dos carotenoide. Nota-se uma diminuição abrupta após os 60min de irradiação tanto na amostra C quanto na D.

Com base neste estudo, para perspectivas de experimentos futuros com o uso desta metodologia, sugeri-se doses de irradiação UV-C por tempos mais curtos, para a obtenção da degradação gradual dos picos do carotenoide.

4.3.3 Simulação da Superfície Marciana

Com a simulação multiparamétrica das condições encontradas na superfície de Marte na AstroCAM, é possível que notar que o período de 12 horas na superfície marciana não é deletério para o carotenoide de *H. salinarum* NRC-1. Neste experimento não foi possível verificar a degradação dos picos do carotenoide em 468 nm, 491 nm e 527 nm. Parte das amostras destes experimento na AstroCam não foram irradiadas (controle câmara/escuro), os picos do carotenoide obtidos por espectroscopia no UV-Vis não demonstram degradação em comparação com a amostra controle fora da câmara (Controle fora/escuro).

Observa-se na Figura 35, uma pequena degradação entre a amostra irradiada (câmara/irradiado) e a amostra não irradiada (controle câmara/escuro), mas ainda assim dentro dos erros experimentais. Isto foi inesperado, devido à alta intensidade dos fluxos de UV, demonstrando a grande resistência do carotenoide de *H. salinarum* NRC-1 na fase sólida em condições marcianas simuladas. Este fato reforça o potencial dos mesmos como bioassinaturas para o caso da superfície marciana.

Figura 35 – Comparação das intensidades dos picos de carotenoide, obtidos por espectroscopia de absorção óptica UV-Vis.





O fluxo de radiação ultravioleta pode ser totalmente deletério para carotenoides, desencadeando reações como as foto-oxidativas prejudiciais à biomoléculas, por exemplo (STAHL; SIES, 2002). Alguns carotenoides de extremófilos já foram testados em condições marcianas, em um experimento similar, Gallo (2016) observou a tendência da diminuição gradual dos picos do carotenoide da bactéria radiotolerante *Deinococcus radiodurans*, após a simulação na AstroCAM. Porém, a metodologia empregada no experimento foi realizada com pó de *D. radiodurans* em substratos inorgânicos, o que dificulta a comparação com os dados obtidos neste experimento. *H. salinarum* NRC-1 se dispõe de carotenoides como mecanismos de resistência à radiação UV, atuando principalmente na proteção celular. Devido à versatilidade fisiológica evidenciada, é possível que outros mecanismos de proteção e capacidade de adaptações diferentes possam vir a ser descobertos, dependendo dos agentes estressores submetidos ao microrganismo. Desta forma, será possível identificar como as condições ambientais extremas afetam essa *Haloarchaea* e outros halófilos extremos.

Nos ensaios realizados na AstroCAM, buscando simular as condições de superfície marciana, não foi possível identificar a degradação dos picos do carotenoide de *H. salinarum* NRC-1. Portanto, o próximo passo para a continuidade dos estudos seria realizar simulações marcianas por períodos mais longos de dias ou semanas, para obter o decaimento nas bandas de interesse. Futuramente, será interessante apurar técnicas diferentes para expor o carotenoide em fase líquida, para o aprofundamento dos dados.

5 Conclusões

Podemos separar as conclusões do trabalho em três partes, de acordo com o modo como cada estudo foi feito.

Na primeira parte, propusemos o crescimento de *Halobacterium salinarum* NRC-1 em concentrações análogas as encontradas na superfície marciana referente a sais de sulfato de magnésio, perclorato de magnésio e perclorato de sódio. Foi realizada a curva de crescimento sob condições ideais de temperatura e agitação.

Na segunda parte, os experimentos referentes à sobrevivência foram desenvolvidos a partir de células de NRC-1 irradiadas com UV-C durante a fase exponencial na presença dos sais descritos a cima em até 1000 J/m^2 .

Na terceira parte, desenvolvemos os experimentos referentes à bioassinatura. Nestes propusemos a degradação do carotenoide de NRC-1, em diferentes condições, para o melhor entendimento de como a técnica de espectroscopia Raman pode ter implicações fundamentais sobre o efeito da radiação UV em danos a biomoléculas, e por consequência, a diminuição ou alteração de bioassinaturas detectáveis. Além disso, realizamos a irradiação do carotenoide de duas maneiras distintas, a fim de elencar a viabilidade da degradação em resposta ao UV-C por espetroscopia UV-Vis. Outra abordagem foi feita referente às tentativas de degradação do carotenoide e potencialmente à detecção de bioassinaturas. No experimento foram simuladas condições da superfície marciana com a AstroCam para fornecer temperatura, pressão, composição atmosférica e fluxos adequados de UV-A UV-B e UV-C através do Simulador Solar, com intuito de verificar a degradação dos picos do carotenoide de NRC-1.

Sumarizamos abaixo os resultados obtidos neste estudo.

i) Foi implementada e padronizada a metodologia para a realização das curvas de crescimento de *H. salinarum* NRC-1 com a presença de concentrações de sulfato de magnésio, perclorato de magnésio e perclorato de sódio. Foi possível observar o padrão típico no comportamento bifásico da curva nas menores concentrações expostas aos sais, baseado em modelos de curva de crescimento de *H. salinarum* NRC-1 descritos na literatura. Além disso, foi possível observar o crescimento de *H. salinarum* NRC-1 em todas as concentrações dos diferentes sais utilizados no experimento.

 ii) Nos testes de sobrevivência ao UV-C realizados com a presença de sulfato de magnésio e sais de perclorato, foi possível observar a tolerância a doses de até 1000 J/m².
Neste critério, não foi possível mensurar de forma quantitativa a sensibilidade à radiação UV-C devido a não obtenção da formação de colônias para contagem de UFC (Unidade Formadora de Colônia). Porém, com metodologia qualitativa foi possível observar que a irradiação não causou nenhum efeito na pigmentação e crescimento de *H. salinarum* NRC-1. Estes resultados mostram que a radiação UV-C na presença de sais de sulfato de magnésio e perclorato até as concentrações testadas não aumenta a letalidade celular.

iii) A alteração do espectro Raman do pó de H. salinarum NRC-1 em substratos de CaCO₃ e SiO₂, demonstram não haver nenhuma proteção ao carotenoide durante a irradiação Solar marciana simulada. Este resultado sugere que para a obtenção do espectro em Raman, as doses deveriam ser menores.

iv) A degradação da célula lisada de *H. salinarum* NRC-1, resultou no desaparecimento gradual dos picos de carotenoide em UV-Vis, quando exposto ao UV-C. Este resultado demonstrou o período em que a dose de irradiação foi capaz de degradar os picos de carotenoide, após houve a estabilização e ligeiro decréscimo.

v) A degradação de biomoléculas em resposta ao UV-C, demonstrou um período maior de estabilização após a irradiação. Pudemos ver o decaimento dos picos de carotenoide e a estabilização, após um lento decréscimo obtido pela espectroscopia UV-Vis.

vi) No experimento de simulação marciana com o uso câmara AstroCam, foram reproduzidas as condições de superfície marciana. Os resultados das medidas de transmitância demonstram que o tempo de exposição foi relativamente curto, por esta razão não foi possível verificar a degradação dos picos do carotenoide em 468 nm, 491 nm e 527 nm. Isso reforça o potencial do uso dos pigmentos de *H. salinarum* NRC-1 como bioassinaturas espectroscópicas em Marte, devido a sua alta resistência.

A arqueia *Halobacterium salinarum* pode servir de modelo astrobiológico em experimentos futuros voltados ao ambiente marciano, devido à resistência aos sais de sulfato e perclorato observadas neste estudo, assim como as doses elevadas de radiação UV-C na presença deles.

Além disso, este trabalho contribuiu para o potencial uso das técnicas espectroscópicas para a procura de bioassinaturas em missões astrobiológicas. Assim sendo, como sugestão para outros experimentos que tenham interesse em analisar a degradação de biomoléculas em tempo real ou *in situ* por meio dos parâmetros e analises utilizadas nesta metodologia.

Referências

ABBEY, W. J. et al. Deep uv raman spectroscopy for planetary exploration: The search for in situ organics. *Icarus*, v. 290, p. 201–214, 2017. Citado na página 29.

ANDREWS-HANNA, J. C.; PHILLIPS, R. J.; ZUBER, M. T. Meridiani planum and the global hydrology of mars. *Nature*, v. 446, n. 7132, p. 163–166, 2007. Citado na página 27.

ATANASOVA, N. S. et al. Global network of specific virus–host interactions in hypersaline environments. *Environmental Microbiology*, v. 14, n. 2, p. 426–440, 2012. Citado na página 25.

BEBLO-VRANESEVIC, K.; HUBER, H.; RETTBERG, P. High tolerance of hydrogenothermus marinus to sodium perchlorate. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 1369, 2017. Citado na página 26.

BIRGE, R. R. Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1016, n. 3, p. 293–327, 1990. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 24.

BLUM, J. S. et al. Bacillus arsenicoselenatis, sp. nov., and bacillus selenitireducens, sp. nov.: two haloalkaliphiles from mono lake, california that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Archives of microbiology*, v. 171, n. 1, p. 19–30, 1998. Citado na página 24.

BROCK, T. et al. *Microbiologia de Brock*. 2010. Citado 6 vezes nas páginas 14, 15, 18, 19, 23 e 24.

CALEGARI-SANTOS, R. et al. Carotenoid production by halophilic archaea under different culture conditions. *Current microbiology*, v. 72, n. 5, p. 641–651, 2016. Citado na página 22.

CAPES, M. D.; DASSARMA, P.; DASSARMA, S. The core and unique proteins of haloarchaea. *BMC genomics*, v. 13, n. 1, p. 39, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 25.

CARRIER, B. L.; KOUNAVES, S. P. The origins of perchlorate in the martian soil. *Geophysical Research Letters*, v. 42, n. 10, p. 3739–3745, 2015. Citado na página 26.

CAVICCHIOLI, R. Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology*, v. 2, n. 3, p. 281–292, 2002. Citado na página 18.

CHEN, X.-R. et al. A unique light-driven proton transportation signal in halorhodopsin from natronomonas pharaonis. *Biophysical journal*, v. 111, n. 12, p. 2600–2607, 2016. Citado na página 24.

CHEVRIER, V. F.; HANLEY, J.; ALTHEIDE, T. S. Stability of perchlorate hydrates and their liquid solutions at the phoenix landing site, mars. *Geophysical Research Letters*, v. 36, n. 10, 2009. Citado na página 26.

COATES, J. D.; ACHENBACH, L. A. Microbial perchlorate reduction: rocket-fuelled metabolism. *Nature reviews. Microbiology*, v. 2, n. 7, p. 569, 2004. Citado na página 25.

DASSARMA, P. et al. Survival of halophilic archaea in earth's cold stratosphere. *Inter*national Journal of Astrobiology, p. 1–7, 2016. Citado na página 16.

DASSARMA, S. Extreme halophiles are models for astrobiology. *Microbe-American Society for Microbiology*, v. 1, n. 3, p. 120, 2006. Citado na página 31.

DAVID, D. G. F.; SANTANA, V. Construção de um espectro-radiômetro para a análise da radiação solar. In: *II Congresso Brasileiro de Energia Solar e III Conferência Regional Latino-Americana da ISES-Florianópolis*. [S.l.: s.n.], 2008. Citado na página 38.

DIAS, A. B. d. A. Filogenia molecular e cultivo de archaea de solos de cerrado sensu strictoc. 2015. Citado na página 15.

DUARTE, R. T. et al. Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology. International Journal of Astrobiology, v. 11, n. 4, p. 325–333, 2012. Citado na página 17.

DUMMER, A. M. et al. Bacterioopsin-mediated regulation of bacterioruberin biosynthesis in halobacterium salinarum. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 20, p. 5658–5667, 2011. Citado na página 23.

EDWARDS, H. G. et al. Raman spectroscopy of natron: shedding light on ancient egyptian mummification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 388, n. 3, p. 683–689, 2007. Citado na página 28.

ESSEN, L.-O. Halorhodopsin: light-driven ion pumping made simple? *Current opinion in structural biology*, v. 12, n. 4, p. 516–522, 2002. Citado na página 23.

FACCIOTTI, M. T. et al. Large scale physiological readjustment during growth enables rapid, comprehensive and inexpensive systems analysis. *BMC systems biology*, v. 4, n. 1, p. 64, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 45.

FALB, M. et al. Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, v. 12, n. 2, p. 177–196, 2008. Citado na página 19.

FARIA, D. d.; MASSABNI, A. Entenda o que é espectroscopia raman. *São Paulo: QuímicaViva-CRQ-IV*, 2011. Citado na página 30.

FENDRIHAN, S. et al. Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 5, n. 2-3, p. 203–218, 2006. Citado na página 22.

FENDRIHAN, S.; MUSSO, M.; STAN-LOTTER, H. Raman spectroscopy as a potential method for the detection of extremely halophilic archaea embedded in halite in terrestrial and possibly extraterrestrial samples. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 40, n. 12, p. 1996–2003, 2009. Citado 5 vezes nas páginas 16, 22, 28, 30 e 31.

FISCHER, E. et al. Experimental evidence for the formation of liquid saline water on mars. *Geophysical research letters*, v. 41, n. 13, p. 4456–4462, 2014. Citado na página 26.

FISK, M. R.; GIOVANNONI, S. J.; THORSETH, I. H. Alteration of oceanic volcanic glass: textural evidence of microbial activity. *Science*, v. 281, n. 5379, p. 978–980, 1998. Citado na página 29.

FROSCH, T. et al. Uv raman imaging a promising tool for astrobiology: Comparative raman studies with different excitation wavelengths on snc martian meteorites. *Analytical chemistry*, v. 79, n. 3, p. 1101–1108, 2007. Citado na página 30.

GALLO, T. M. Implicações da resiliência de biomoléculas e efeitos de substrato em ambientes planetários simulados de alta radiação para a detecção de bioassinaturas espectroscópicas. 2016. Citado 2 vezes nas páginas 36 e 60.

GENDRIN, A. et al. Sulfates in martian layered terrains: the omega/mars express view. *Science*, v. 307, n. 5715, p. 1587–1591, 2005. Citado na página 26.

GLAVIN, D. P. et al. Evidence for perchlorates and the origin of chlorinated hydrocarbons detected by sam at the rocknest aeolian deposit in gale crater. *Journal of Geophysical Research: Planets*, v. 118, n. 10, p. 1955–1973, 2013. Citado na página 26.

GONZÁLEZ, F. H. D. 6. bioquímica clínica. *PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA: TEXTO INTRODUTÓRIO*, p. 140, 1998. Citado na página 31.

GONZALEZ, O. et al. Systems analysis of bioenergetics and growth of the extreme halophile halobacterium salinarum. *PLoS computational biology*, v. 5, n. 4, p. e1000332, 2009. Citado na página 19.

GROSS, C. et al. Mawrth vallis–an auspicious destination for the esa and nasa 2020 landers. In: *Lunar and Planetary Science Conference*. [S.l.: s.n.], 2017. v. 48. Citado na página 29.

HAMMER, U. Saline lakes. [S.l.: s.n.], 1983. Citado na página 25.

HASKIN, L. A. et al. Water alteration of rocks and soils on mars at the spirit rover site in gusev crater. *Nature*, v. 436, n. 7047, p. 66–69, 2005. Citado na página 26.

HAYS, L. E. et al. Biosignature preservation and detection in mars analog environments. *Astrobiology*, v. 17, n. 4, p. 363–400, 2017. Citado na página 29.

HECHT, M. et al. Detection of perchlorate and the soluble chemistry of martian soil at the phoenix lander site. *Science*, v. 325, n. 5936, p. 64–67, 2009. Citado na página 26.

HOLMSTRÖM, M.; BARABASH, S.; KALLIO, E. X-ray imaging of the solar wind—mars interaction. *Geophysical research letters*, v. 28, n. 7, p. 1287–1290, 2001. Citado na página 26.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles. In: *Extremophiles*. [S.l.: s.n.], 2016. p. 53–78. Citado na página 18.

HORIKOSHI, K.; BULL, A. T. Prologue: Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles. In: *Extremophiles handbook*. [S.l.: s.n.], 2011. p. 3–15. Citado na página 18.

HUNTEN, D. M. Possible oxidant sources in the atmosphere and surface of mars. *Journal of Molecular Evolution*, v. 14, n. 1, p. 71–78, 1979. Citado na página 26.

JAKOSKY, B. M. et al. Mars atmospheric loss and isotopic fractionation by solar-windinduced sputtering and photochemical escape. *Icarus*, v. 111, n. 2, p. 271–288, 1994. Citado na página 27. JAVOR, B. J. Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry. [S.l.: s.n.], 2012. Citado na página 25.

JEHLIČKA, J.; EDWARDS, H.; OREN, A. Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic archaea and bacteria: a raman spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 106, p. 99–103, 2013. Citado na página 31.

JOHNSON, D. B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS microbiology ecology*, v. 27, n. 4, p. 307–317, 1998. Citado na página 18.

KIM, Y. S. et al. Radiation-induced formation of chlorine oxides and their potential role in the origin of martian perchlorates. *Journal of the American Chemical Society*, v. 135, n. 13, p. 4910–4913, 2013. Citado na página 27.

KISH, A. et al. Salt shield: intracellular salts provide cellular protection against ionizing radiation in the halophilic archaeon, halobacterium salinarum nrc-1. *Environmental microbiology*, v. 11, n. 5, p. 1066–1078, 2009. Citado na página 21.

Kish, A. et al. Salt shield: intracellular salts provide cellular protection against ionizing radiation in the halophilic archaeon, halobacterium salinarum nrc-1. *Environmental microbiology*, v. 11, n. 5, p. 1066–1078, 2009. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley-.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2008.01828.x/full. Citado na página 21.

KLEIN, C. et al. The membrane proteome of halobacterium salinarum. *Proteomics*, v. 5, n. 1, p. 180–197, 2005. Citado na página 19.

KOONIN, E. V.; WOLF, Y. I. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic acids research*, v. 36, n. 21, p. 6688–6719, 2008. Citado na página 15.

KOTTEMANN, M. et al. Physiological responses of the halophilic archaeon halobacterium sp. strain nrc1 to desiccation and gamma irradiation. *Extremophiles*, v. 9, n. 3, p. 219–227, 2005. Citado na página 25.

KOUNAVES, S. P. et al. Evidence of martian perchlorate, chlorate, and nitrate in mars meteorite eeta79001: Implications for oxidants and organics. *Icarus*, v. 229, p. 206–213, 2014. Citado na página 26.

LANYI, J. K. The role of na+ in transport processes of bacterial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, v. 559, n. 4, p. 377–397, 1979. Citado na página 24.

LAYE, V. J.; DASSARMA, S. An antarctic extreme halophile and its polyextremophilic enzyme: Effects of perchlorate salts. *Astrobiology*, 2017. Citado na página 44.

LENTON, S. et al. Highly compressed water structure observed in a perchlorate aqueous solution. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 919, 2017. Citado na página 26.

LEUKO, S. et al. The survival and resistance of halobacterium salinarum nrc-1, halococcus hamelinensis, and halococcus morrhuae to simulated outer space solar radiation. *Astrobiology*, v. 15, n. 11, p. 987–997, 2015. Citado na página 49. LEUKO, S.; RETTBERG, P. The effects of hze particles, γ and x-ray radiation on the survival and genetic integrity of halobacterium salinarum nrc-1, halococcus hamelinensis, and halococcus morrhuae. *Astrobiology*, v. 17, n. 2, p. 110, 2017. Citado na página 21.

LEUKO, S.; ROTHSCHILD, L.; BURNS, B. Halophilic archaea and the search for extinct and extant life on mars. *Journal of Cosmology*, v. 5, p. 940–950, 2010. Citado 3 vezes nas páginas 20, 22 e 30.

MADERN, D.; EBEL, C.; ZACCAI, G. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, v. 4, n. 2, p. 91–98, 2000. Citado 3 vezes nas páginas 16, 18 e 24.

MALHERBE, C. et al. Accurate differentiation of carotenoid pigments using flight representative raman spectrometers. *Astrobiology*, v. 17, n. 4, p. 351–362, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 31.

MANCINELLI, R. et al. Brines and evaporites: analogs for martian life. Advances in space Research, v. 33, n. 8, p. 1244–1246, 2004. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.

MARSHALL, C. P.; EDWARDS, H. G.; JEHLICKA, J. Understanding the application of raman spectroscopy to the detection of traces of life. *Astrobiology*, v. 10, n. 2, p. 229–243, 2010. Citado na página 30.

MARSHALL, C. P. et al. Carotenoid analysis of halophilic archaea by resonance raman spectroscopy. *Astrobiology*, v. 7, n. 4, p. 631–643, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 31.

MARTINHO, J. Espectroscopia de absorção no ultra-violeta e visível. *Centro de Química-Física Molecular*, p. 44–48, 1994. Citado na página 38.

MATSUBARA, T. et al. Earth analogues for past and future life on mars: isolation of perchlorate resistant halophiles from big soda lake. *International Journal of Astrobiology*, v. 16, n. 3, p. 218–228, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 44.

MCCREADY, S.; MARCELLO, L. Repair of UV damage in Halobacterium salinarum. 2003. Citado na página 51.

MCGENITY, T. J. The immortal, halophilic superhero: Halobacterium salinarum–a longlived poly-extremophile. In: *Annual Conference*. [S.l.: s.n.], 2017. v. 2017, n. 13. Citado na página 20.

MICHAEL, T. M. et al. Biology of microorganisms. *Pearson Education, Inc. Upper Saddle River, New Jersey*, p. 66–67, 2003. Citado na página 18.

MICHALSKI, J. R. et al. Groundwater activity on mars and implications for a deep biosphere. *Nature Geoscience*, v. 6, n. 2, p. 133–138, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 29.

MIRANDA, V. S. et al. Carotenóides de bactérias halófilas= produção, caracterização e atividade antioxidante. 2010. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 22.

MIRONOVA, O. et al. Functional characterization of sensory rhodopsin ii from halobacterium salinarum expressed in escherichia coli. *FEBS letters*, v. 579, n. 14, p. 3147–3151, 2005. Citado na página 24.

MOLINA-CUBEROS, G. et al. Cosmic ray and uv radiation models on the ancient martian surface. *Icarus*, v. 154, n. 1, p. 216–222, 2001. Citado na página 26.

MOTZER, W. E. Perchlorate: problems, detection, and solutions. *Environmental Forensics*, v. 2, n. 4, p. 301–311, 2001. Citado na página 25.

NAVARRO-GONZÁLEZ, R. et al. Reanalysis of the viking results suggests perchlorate and organics at midlatitudes on mars. *Journal of Geophysical Research: Planets*, v. 115, n. E12, 2010. Citado na página 26.

NAYEK, A. et al. Salt-bridge energetics in halophilic proteins. *Plos one*, v. 9, n. 4, p. e93862, 2014. Citado na página 19.

NG, W. V. et al. Genome sequence of halobacterium species nrc-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 22, p. 12176–12181, 2000. Citado 3 vezes nas páginas 19, 20 e 21.

OESTERHELT, D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Current opinion in structural biology*, v. 8, n. 4, p. 489–500, 1998. Citado na página 23.

OJHA, L. et al. Spectral evidence for hydrated salts in recurring slope lineae on mars. *Nature Geoscience*, v. 8, n. 11, p. 829–832, 2015. Citado na página 26.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Archaeal genomics: an overview. *Cell*, v. 89, n. 7, p. 991–994, 1997. Citado na página 15.

OREN, A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 1, p. 56–63, 2002. Citado na página 25.

OREN, A. *Halophilic microorganisms and their environments*. [S.l.: s.n.], 2002. Citado 3 vezes nas páginas 19, 23 e 24.

OREN, A. Halophilic archaea on earth and in space: growth and survival under extreme conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 372, n. 2030, p. 20140194, 2014. Citado na página 28.

OREN, A.; BARDAVID, R. E.; MANA, L. Perchlorate and halophilic prokaryotes: implications for possible halophilic life on mars. *Extremophiles*, v. 18, n. 1, p. 75–80, 2014. Citado na página 25.

OSTERLOO, M. et al. Chloride-bearing materials in the southern highlands of mars. *Science*, v. 319, n. 5870, p. 1651–1654, 2008. Citado na página 26.

OWEN, T. et al. The composition of the atmosphere at the surface of mars. *Journal of Geophysical research*, v. 82, n. 28, p. 4635–4639, 1977. Citado na página 26.

PATELA, M.; ZARNECKIA, J.; CATLINGB, D. Ultraviolet radiation on the surface of mars and the beagle 2 uv sensor. *Planetary and Space Science*, v. 50, p. 915–927, 2002. Citado na página 41.

PAULINO-LIMA, I. G. et al. Survival of deinococcus radiodurans against laboratorysimulated solar wind charged particles. *Astrobiology*, v. 11, n. 9, p. 875–882, 2011. Citado na página 15.

PECK, R. F.; JOHNSON, E. A.; KREBS, M. P. Identification of a lycopene β -cyclase required for bacteriorhodopsin biogenesis in the archaeon halobacterium salinarum. *Journal* of bacteriology, v. 184, n. 11, p. 2889–2897, 2002. Citado na página 24.

PEREIRA, F. N. Além da Antártica: os limites da vida ao frio e à dessecação no âmbito da astrobiologia. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2015. Citado na página 17.

PERKAMPUS, H.-H.; GRINTER, H.-C. UV-VIS Spectroscopy and its Applications. [S.l.: s.n.], 1992. Citado na página 31.

PFEIFER, F. et al. Gas vesicle formation in halophilic archaea. *Archives of microbiology*, v. 167, n. 5, p. 259–268, 1997. Citado na página 20.

PFEIFFER, F. et al. Evolution in the laboratory: the genome of halobacterium salinarum strain r1 compared to that of strain nrc-1. *Genomics*, v. 91, n. 4, p. 335–346, 2008. Citado na página 21.

PONTEFRACT, A. et al. Microbial diversity in a hypersaline sulfate lake: A terrestrial analog of ancient mars. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1819, 2017. Citado na página 25.

RAMPELOTTO, P. H. Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. *Sustainability*, v. 2, n. 6, p. 1602–1623, 2010. Citado na página 18.

ROACH, L. et al. Testing evidence of recent hydration state change in sulfates on mars. *Journal of Geophysical Research: Planets*, v. 114, n. E2, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.

ROCHA, F. R.; TEIXEIRA, L. S. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria uv-vis. *Química nova*, v. 27, p. 807–812, 2004. Citado na página 31.

RODRIGUES, F. et al. Astrobiology in brazil: early history and perspectives. *International Journal of Astrobiology*, v. 11, n. 04, p. 189–202, 2012. Citado na página 15.

ROTHSCHILD, L. J. Earth analogs for martian life. microbes in evaporites, a new model system for life on mars. *Icarus*, v. 88, n. 1, p. 246–260, 1990. Citado na página 28.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. *Nature*, v. 409, n. 6823, p. 1092–1101, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 17.

SAGASTUME, V. et al. Microorganismos en ambientes extremos. Citado na página 24.

SALLOTO, G. R. B. et al. A biologia das arqueias halofílicas e seu potencial biotecnológico. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 10, n. 2, p. 226, 2012. Citado na página 25.

SCHOBERT, B.; LANYI, J. K. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *Journal of Biological Chemistry*, v. 257, n. 17, p. 10306–10313, 1982. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 24.
SCHUTTLEFIELD, J. D. et al. Photooxidation of chloride by oxide minerals: Implications for perchlorate on mars. *Journal of the American Chemical Society*, v. 133, n. 44, p. 17521–17523, 2011. Citado na página 27.

SEINFELD, J. H.; PANDIS, S. N. Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change. [S.l.: s.n.], 2016. Citado na página 26.

SEPHTON, M. A.; CARTER, J. N. The chances of detecting life on mars. *Planetary and Space Science*, v. 112, p. 15–22, 2015. Citado na página 28.

SHAND, R. F.; BETLACH, M. C. Expression of the bop gene cluster of halobacterium halobium is induced by low oxygen tension and by light. *Journal of bacteriology*, v. 173, n. 15, p. 4692–4699, 1991. Citado na página 44.

SHIVANAND, P.; MUGERAYA, G. Halophilic bacteria and their compatible solutes– osmoregulation and potential applications. *Current science*, p. 1516–1521, 2011. Citado na página 18.

SHOLES, S. F. et al. Anoxic atmospheres on mars driven by volcanism: Implications for past environments and life. *Icarus*, v. 290, p. 46–62, 2017. Citado na página 26.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids and protection against solar uv radiation. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 15, n. 5, p. 291–296, 2002. Citado na página 60.

STOECKENIUS, W.; LOZIER, R. H.; BOGOMOLNI, R. A. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, v. 505, n. 3-4, p. 215–278, 1979. Citado na página 23.

TALAUE, C. O. et al. Model construction and analysis of respiration in halobacterium salinarum. *PloS one*, v. 11, n. 3, p. e0151839, 2016. Citado na página 19.

TENCHOV, B. et al. Salt tolerance of archaeal extremely halophilic lipid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 15, p. 10016–10023, 2006. Citado na página 18.

TEUFEL, K. et al. Variations in the multiple tbp genes in different halobacterium salinarum strains and their expression during growth. *Archives of microbiology*, v. 190, n. 3, p. 309–318, 2008. Citado na página 21.

TOSCA, N. J. et al. Geochemical modeling of evaporation processes on mars: Insight from the sedimentary record at meridiani planum. *Earth and Planetary Science Letters*, v. 240, n. 1, p. 122–148, 2005. Citado na página 27.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. Limnologia. [S.l.: s.n.], 2016. Citado na página 25.

TWELLMEYER, J. et al. Microarray analysis in the archaeon halobacterium salinarum strain r1. *PLoS One*, v. 2, n. 10, p. e1064, 2007. Citado na página 21.

VAUCLARE, P. et al. Molecular adaptation and salt stress response of halobacterium salinarum cells revealed by neutron spectroscopy. *Extremophiles*, v. 19, n. 6, p. 1099–1107, 2015. Citado na página 19.

VENTOSA, A.; OREN, A.; MA, Y. Halophiles and hypersaline environments: current research and future trends. [S.l.: s.n.], 2011. Citado na página 24.

VÍTEK, P. Identification of microbial pigments in evaporites using raman spectroscopy: implications for astrobiology. 2010. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 29.

WADSWORTH, J.; COCKELL, C. S. Perchlorates on mars enhance the bacteriocidal effects of uv light. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 4662, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 49.

WHITMIRE, S. et al. Protein flexibility and conformational state: A comparison of collective vibrational modes of wild-type and d96n bacteriorhodopsin. *Biophysical journal*, v. 85, n. 2, p. 1269–1277, 2003. Citado na página 23.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977. Citado na página 15.