

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

APLICAÇÕES DE TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO NA CARACTERIZAÇÃO DE EXTREMÓFILOS VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES BIOLÓGICOS EM SISTEMAS PLANETÁRIOS

STEFANIE D. CARVALHO¹, LUANDER BERNARDES²

¹ Graduanda do Curso de Licenciatura em Química, IFSP, Campus Sertãozinho, s.danelon@aluno.ifsp.edu.br.

² Professor Doutor do Curso de Licenciatura em Química, IFSP, Sertãozinho, bernardes.luander@ifsp.edu.br.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 1.04.02.00-4 Astrofísica Estelar

RESUMO: A *Halobacterium salinarum* é uma arqueia capaz de sobreviver em ambientes extremos como, por exemplo, aqueles onde há severa exposição à radiação e altas concentrações de sais: salinas e lagos salgados. Esse micro-organismo extremófilo se destaca no contexto da astrobiologia, já que devido a algumas de suas características especiais de sobrevivência, torna-se uma fonte potencial de material biológico apto a fornecer sinais que denunciem a presença de vida em solo marciano ou até mesmo em atmosferas de exoplanetas. Entretanto, pouco se conhece sobre as principais bandas de absorção no infravermelho associadas ao material biológico desse halófilo. Assim, o estudo e a caracterização espectroscópica desse extremófilo terrestre é de fundamental importância no contexto de busca de vida extraterrestre. Nesta pesquisa, amostras contendo material genético da arqueia (DNA purificado) foram analisadas por meio de técnicas de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A região do espectro estudada cobriu a faixa espectral compreendida entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , e os espectros foram pré-processados e analisados com a utilização do software *OrinLab*. Procedimentos de normalização espectral, correções de linha de base, suavização (algoritmo *Savitzky-Golay*), testes de segunda derivada e deconvolução gaussiana foram aplicados na análise dos espectros. Os resultados mostram várias bandas características do DNA da arqueia que constituem bioassinaturas incontestáveis, quando se pensa em busca de vida no universo: 1240 cm^{-1} , 1228 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} e 968 cm^{-1} .

PALAVRAS-CHAVE: *Halobacterium salinarum*; Astrobiologia; FTIR; Extremófilos; Bioassinaturas.

APPLICATIONS OF INFRARED SPECTROSCOPY TECHNIQUES IN THE CHARACTERIZATION OF EXTREMOPHILES AIMING AT THE IDENTIFICATION OF BIOLOGICAL MARKERS IN PLANETARY SYSTEMS

ABSTRACT: RESUMO: *Halobacterium salinarum* is an archaean capable of surviving in extreme environments, such as those where there is severe exposure to radiation and high concentrations of salts: salt pans and salt lakes. This extremophile microorganism stands out in the context of astrobiology, since due to some of its special survival characteristics, it becomes a potential source of biological material capable of providing signals that denounce the presence of life in Martian soil or even in exoplanet atmospheres. However, little is known about the main infrared absorption bands associated with the biological material of this halophile. Thus, the study and spectroscopic characterization of this

terrestrial extremophile is of fundamental importance in the context of the search for extraterrestrial life. In this research, samples containing genetic material from the archaea (purified DNA) were analyzed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) techniques. The region of the spectrum studied covered the spectral range between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} , and the spectra were pre-processed and analyzed using the *OrinLab software*. Spectral normalization procedures, baseline corrections, smoothing (*Savitzky-Golay algorithm*), second derivative tests and Gaussian deconvolution were applied in the analysis of the spectra. The results show several characteristic bands of archaean DNA that constitute indisputable biosignatures, when thinking about the search for life in the universe: 1240 cm^{-1} , 1228 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} and 968 cm^{-1} .

KEYWORDS: *Halobacterium salinarum*; Astrobiology; FTIR; Extremophiles; Biosignatures.

INTRODUÇÃO

A hipótese de vida extraterrestre em Marte e outros corpos celestes sempre estimulou a imaginação humana. Marte, apresenta condições hostis para a maioria das formas de vida conhecidas na Terra, já que possui ambientes extremos caracterizados por baixas temperaturas, escassez de água líquida e ausência de uma atmosfera densa, tornando-o um nicho potencial para a existência de organismos extremófilos (Bernardes, 2012).

A exploração de planetas fora do Sistema Solar é limitada pelas grandes distâncias, impedindo a investigação *in situ*. No entanto, nas próximas décadas, telescópios espaciais poderão examinar com grande precisão as atmosferas desses objetos em busca de bioassinaturas como moléculas de DNA, RNA, clorofila e carotenóides, ou até mesmo micro-organismos, isto é, bactérias e arqueias. Esse conjunto de biomarcadores podem ser considerados provas irrefutáveis da presença de vida (Bernardes, 2018). Assim, exoplanetas que apresentam mecanismos de ejeção de particulados semelhantes aos terrestres (vulcões, ventos, impactos etc.) podem ter suas atmosferas contaminadas com vários tipos de materiais biológicos (Bernardes, 2018).

Para a identificação de assinaturas espectrais biológicas em ambientes extraterrestre, é necessário o uso de tecnologias avançadas e o conhecimento prévio das principais bandas de absorção relacionadas à sua existência. A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica espectroscópica de uso crescente na identificação de micro-organismos, sendo empregada para caracterizar um conjunto especial deles, os halófilos, candidatos potenciais a serem encontrados em ambientes similares aos evaporitos terrestres (solo marciano) ou na atmosfera de exoplanetas (Hornemann *et al.*, 2017; Onga, 2021; Bernardes, 2018). A criação de um banco de dados robusto com as bandas de absorção de DNA de arqueias visa apoiar futuras missões na busca por sinais de vida no universo.

MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico utilizado na pesquisa foi obtido por meio de processos de isolamento e purificação de DNA do micro-organismo halófilo *Halobacterium salinarum* da linhagem NRC-1, seguindo o protocolo *DNeasy Blood and Tissues kit* (Qiagen), em concordância com as instruções do fabricante. Foi quantificado a concentração e os índices de qualidade amostrais com a utilização do espectrofotômetro *NanoVue* (GE Healthcare). Após a extração, o DNA foi armazenado e encaminhado para o laboratório de espectroscopia. Ressalta-se, que a linhagem utilizada foi crescida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, na presença de luz e com agitação de 125 RPM, até atingir OD_{600nm} de aproximadamente 0,5 (Bernardes, 2018). É interessante notar que além de ser uma candidata a habitar planetas com condições semelhantes à Terra primitiva ou mesmo ambientes hostis como a superfície marciana, essa arqueia extremófila é de fácil cultivo em laboratório, apresentado condições ideais de crescimento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 4-5 mol/L de NaCl.

Todos os espectros no infravermelho associados ao DNA da arqueia foram obtidos na faixa espectral compreendida entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , no modo de absorbância, com 32 varreduras à temperatura controlada entre 18 e $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O equipamento utilizado para a tomada dos espectros foi o espectrofotômetro *Vertex* (Bernardes, 2018). Os espectros foram pré-processados com o *software OrinLab* por meio de: correção de linha de base, suavização espectral utilizando

algoritmo *Savitzky-Golay* com 9 pontos, normalização e deconvolução de bandas espectrais complexas com o auxílio da segunda derivada.

Após a análise espectral das amostras contendo 100 ng/μl de DNA purificado, iniciou-se o planejamento e a construção de um banco de dados com as principais bandas de absorção da molécula. A ideia é fornecer aos astrônomos condições para identificar de maneira fácil e rápida um sinal associado à vida. Todas as etapas da pesquisa podem ser visualizadas na figura 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro de absorção da molécula de DNA da arqueia *Halobacterium salinarum* é mostrado na figura 1. Ele foi dividido em quatro regiões: a primeira de 1791 cm⁻¹ a 1480 cm⁻¹, a segunda de 1480 cm⁻¹ a 1161 cm⁻¹, a terceira de 1161 cm⁻¹ a 920 cm⁻¹ e a quarta de 920 cm⁻¹ a 460 cm⁻¹. A região espectral de 4000 cm⁻¹ a 1797 cm⁻¹ foi desconsiderada, pois apresenta uma banda de absorção muito intensa associada à presença de água. A região espectral na faixa entre 1791 cm⁻¹ e 1480 cm⁻¹, mostra absorções relacionadas à presença amidas, isto é, correspondem às vibrações de estiramento N-H de amidas e C-H dos grupos funcionais que incluem carboxila, carbonila e cetona de várias proteínas e peptídeos. Nessa faixa espectral, as bandas amidas I e II podem ser encontradas em torno de 1664 cm⁻¹ e 1598 cm⁻¹ (Hornemann *et al.*, 2017; Ricachenevsky, 2020).

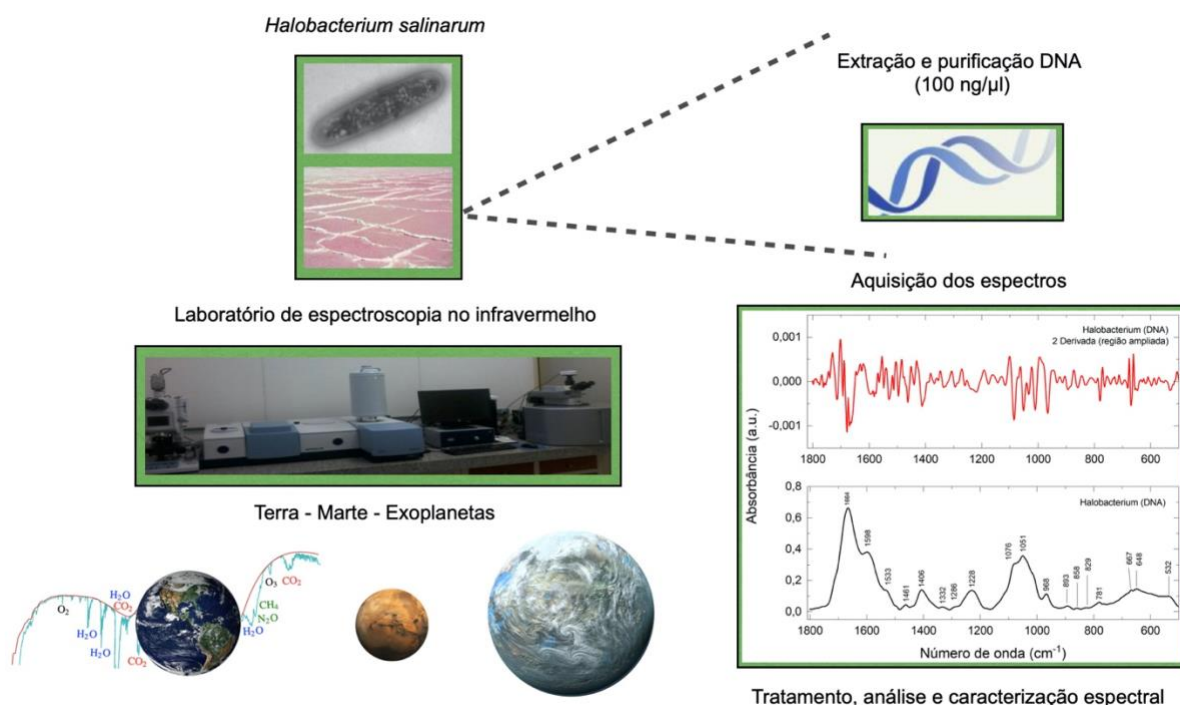


FIGURA 1. A figura mostra as etapas da pesquisa desde a extração e purificação do DNA da arqueia *Halobacterium salinarum*, passando pela aquisição dos espectros, tratamento, análise dos dados e identificação das principais bandas de absorção associadas ao material biológico do micro-organismo. Destaca-se ainda alguns gases presentes na atmosfera terrestre e potenciais alvos da pesquisa (Marte e exoplanetas do tipo Superterra).

Na chamada "região mista", que abrange números de onda compreendidos entre 1480 cm⁻¹ e 1161 cm⁻¹ (Hornemann *et al.*, 2017), foram identificadas vibrações ligadas à presença de proteínas, ácidos lipídicos e compostos fosfatados. As bandas de absorção na região entre 1161 cm⁻¹ e 920 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações ao longo da estrutura açúcar-fosfato da espinha dorsal do DNA. Já as absorções que aparecem na região entre 920 cm⁻¹ e 460 cm⁻¹, demonstram a presença conformacional do açúcar (Qiu, 2014).

A tabela 1 apresenta algumas das principais bandas de absorção da molécula de DNA do micro-organismo extremófilo *Halobacterium salinarum* e que constituirão um banco de dados contendo bioassinaturas. Ela apresenta o pico central da banda observada e a sua designação como, por exemplo, o estiramento da Ribose, que pode ser observado em um número de onda próximo a 1050 cm⁻¹ (C-O).

TABELA 1. Algumas bandas de absorção do DNA da arqueia *Halobacterium salinarum*

Banda observada (cm ⁻¹)	Resíduos de moléculas	Designação
1664	C=O	Alongamento amida primária
1533		Flexão N-H de amida secundária, alongamento C-N
1461	CH ₃	Flexão assimétrica lipídios
1240	PO ₂ ⁻	RNA
1228	PO ₂ ⁻	Estiramento assimétrico DNA
1050	C-O	Estiramento ribose
968		Movimentos esqueléticos de DNA ribose-fosfato
648	N-H	Amida secundária

Os resultados da caracterização da molécula de DNA, demonstram a viabilidade do uso de técnicas de espectroscopia no infravermelho para o estudo de micro-organismos, assim como a importância da construção de repositórios contendo informações sobre as principais bandas de absorção ligadas à vida, ou seja, aquelas que podem servir como prova irrefutável de sua presença no universo. Desse modo, a detecção de bandas de absorção centradas em números de onda próximos a 1228 cm⁻¹, 1050 cm⁻¹ e 968 cm⁻¹, seria um forte indício da presença de extremófilos halófilos em solo marciano ou mesmo na atmosfera de exoplanetas. Ressalta-se ainda, que a identificação de um conjunto de bandas pode ajudar a minimizar o efeito de falso-positivo, já que sequências específicas de absorções podem se diferenciar dos marcadores ligados a gases atmosféricos ou a outros compostos presentes na superfície planetária.

CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foi possível identificar alguns marcadores biológicos ligados à molécula de DNA do micro-organismo extremófilo *Halobacterium salinarum*. As análises foram realizadas com o auxílio de várias técnicas de espectroscopia no infravermelho, cobrindo uma faixa espectral compreendida entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹. Os dados foram tratados com o uso do *software OriginLab* e técnicas específicas foram utilizadas para a identificação correta das bandas de absorção molecular: correção de linha de base, suavização espectral, normalização e deconvolução de bandas espectrais complexas com o auxílio da segunda derivada. Os primeiros resultados mostram que algumas bandas de absorção são importantes na busca de um sinal compatível com o que se define como vida, ou seja, considerando uma visão antrópica do termo, onde o DNA (ou parte dele) seria uma prova irrefutável de sua existência. Logo, absorções ligadas diretamente a movimentos esqueléticos da estrutura do DNA ou aos processos de estiramentos de Riboses/DNA, podem nos fornecer pistas sobre a história da habitabilidade do ambiente planetário estudado, seja em uma exploração in situ como, o caso de Marte, ou uma exploração remota como, o caso do envoltório gasoso de exoplanetas.

Assim, seguindo Bernardes (2018), a pesquisa coloca em evidência a possibilidade de caracterização de sistemas planetários por meio do estudo espectroscópico de micro-organismos extremófilos, já que eles possuem características especiais de sobrevivência a condições extremas (resistência à radiação, às variações de temperatura, a altas pressões etc.), podem contaminar vários ambientes (solo, atmosfera etc.) e são estudados facilmente em laboratórios. O próximo passo da pesquisa é identificar bandas complexas do espectro da arqueia por meio de técnicas de deconvolução, com o objetivo de identificar bandas sobrepostas. Após a finalização desse processo complexo será possível finalizar a primeira etapa da construção do banco de dados contendo as principais bandas de

absorção molecular ligadas à presença de vida que podem auxiliar os astrônomos no estudo da superfície marciana e das atmosferas de planetas extrasolares.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

S.D.C. contribuiu com a análise dos dados. L.B contribuiu na realização dos espectros. S.D.C e L.B atuaram na redação do trabalho.

Todos os autores contribuíram com a revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Luander Bernardes, por todo apoio e ajuda na conclusão deste trabalho.

Agradeço a minha família por acreditar na minha capacidade, pelo incentivo a pesquisa e compreensão.

Aos meus irmãos, Manuela Danelon de Carvalho e Leonardo Danelon de Carvalho, pelo companheirismo e apoio.

REFERÊNCIAS

BERNARDES, L. A Terra como um Exoplaneta. **Tese (Doutorado em Astronomia)** – Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Universidade de São Paulo. São Paulo, p.132.2018.

BERNARDES, L. Exoplanetas, Extremófilos e Habitabilidade. 2012. **Dissertação (Mestrado em Astronomia)** - Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Universidade de São Paulo, São Paulo: 2012.

HORNEMANN, A. *et al.* A pilot study on fingerprinting Leishmania species from the Old-World using Fourier transform infrared spectroscopy. [S. l.]: **Anal Bioanal Chem**, 2017.

LEUCO, S.; DOMINGOS, C; PARPART, A; REITZ, G.; RETTBERG, P. The Survival and Resistance of Halobacterium salinarum NRC-1, Halococcus hamelinensis, and Halococcus morrhuae to Simulated Outer Space Solar Radiation. [S. l.]: **Astrobiology**, 2015.

ONGA, E. A. Perfil transcricional da haloarqueia Halobacterium salinarum NRC-1 sob estresse osmótico. 2021. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo: Ribeirão Preto, 2021.

QIU, L.; WANG, Z.; LIU, P.; LIU, R.; CAI, C.; FAN, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the DNA of the Chuxiong Population of Camellia reticulata Lindl. of China. [S. l.]: **Spectroscopy Letters**, 2015.

RICACHENEVSKY, C.; PEREIRA, Douglas C.; SIMIONI, A. R.; JUNIOR, M. B.; SAKANE, K. K. Determinação de cloridrato de fluoxetina em medicamentos por espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de fourier. Novo Hamburgo: **Revista Tecnologia e Tendências**, 2020.

STUART, B. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Londres: **Wiley**, 2004.