

Relatório Final

Influência do Fe^{3+} na Resistência de Microrganismos Dessecados à Radiação UV: implicações para a vida em marte

Aluno

Luca Marinho Nassser Valadares Paiva

<http://lattes.cnpq.br/1636320272608848>

Orientador

Fábio Rodrigues

<http://lattes.cnpq.br/5822376591265210>

Período: 01/09/2024 à 31/08/2025

Universidade de São Paulo

Agosto 2025

Resumo

Embora o íon férrico (Fe^{3+}) já tenha sido associado a possíveis efeitos fotoprotetores contra radiação UV em sistemas aquosos, pouco se sabe sobre seu impacto em condições anidras, como as que podem ocorrer no regolito marciano. Neste estudo, foi avaliado a resposta de um microrganismo submetido a estresses combinados de dessecação e irradiação UV-C na presença de Fe^{3+} . Diferente do esperado, o íon não conferiu proteção. Em ambientes dessecados, aumentou a mortalidade celular, indicando um efeito tóxico. Os resultados sugerem que, sob estresse hídrico, o Fe^{3+} pode atuar como fator limitante à sobrevivência microbiana, em vez de protetor. Esses achados ajudam a esclarecer o papel de compostos de ferro em cenários de habitabilidade marciana e ampliam a compreensão sobre a interação entre múltiplos estresses em organismos expostos a ambientes extremos.

Palavras Chave: Radiação UV; Marte; Ferro férrico;

Sumário

1	Introdução	3
2	Materiais e Métodos	5
3	Resultados	7
3.1	Resistência a FeCl_3	7
3.2	Avaliação de Métodos de Dessecação	7
3.3	Dessecação na Presença de Ferro	8
3.4	Resistência a UV-C em Células Dessecadas	9
4	Discussão	11
5	Conclusões e Perspectivas Futuras	14
A	Receitas Utilizadas	19
B	Protocolos Experimentais	22
B.1	Obtenção e Estoque de Culturas	22
B.2	Ensaio de Resistência a FeCl_3	23
B.3	Ensaio de Resistência à Dessecação	24
B.4	Ensaio de Resistência à Radiação UVC	26
B.5	Ensaio de Resistência à Dessecação com Ferro (Qualitativo)	27
C	Resultados Detalhados, Figuras e Dados Brutos	27
C.1	Ensaio de Resistência a FeCl_3	28
C.2	Ensaio de resistência à Dessecação	32
C.3	Ensaio de resistência à Radiação UVC	32

1 Introdução

A astrobiologia é um campo interdisciplinar que busca compreender a origem, a evolução e os limites da vida, bem como avaliar a possibilidade de sua existência em outros mundos (Domagal-Goldman et al., 2016; Galante et al., 2016). Mais do que a simples busca por organismos extraterrestres, essa área se apoia em modelos derivados do estudo de extremófilos terrestres, organismos capazes de sobreviver em condições de estresse como alta radiação, acidez ou dessecação. Tais organismos revelam os limites da vida e oferecem pistas sobre potenciais adaptações em ambientes extraterrestres (Rothschild and Mancinelli, 2001).

Entre os corpos do Sistema Solar, Marte é um dos mais promissores candidatos à habitabilidade. Evidências geológicas e mineralógicas indicam que no passado remoto o planeta manteve água líquida em sua superfície, sugerindo condições mais favoráveis à vida (Carr and Head, 2010). Entretanto, a superfície atual de Marte é extremamente hostil, a baixa pressão atmosférica e a ausência de uma camada significativa de ozônio permitem que fluxos intensos de radiação ultravioleta (UV) atinjam diretamente o solo (Cockell et al., 2000; Patel et al., 2002). Estudos recentes mostram que a radiação UV-C no solo marciano pode atingir valores entre 2,5 a 3,5 W/m^2 (Horne et al., 2022). Enquanto a Terra bloqueia quase toda a radiação UV-C, em Marte essa faixa altamente energética incide praticamente sem atenuação (Rontó et al., 2003). A consequência é um ambiente em que moléculas biológicas essenciais sofrem danos severos, incluindo a formação de dímeros de timina no DNA e alterações estruturais em proteínas, levando à perda de viabilidade celular (Kochevar, 1990; Kulms and Schwarz, 2000; Rastogi et al., 2010).

Apesar desse cenário hostil, estratégias de proteção podem ter permitido nichos habitáveis. Um exemplo na Terra é a vida endolítica, que se desenvolve em microambientes dentro de rochas, protegida da radiação direta (Friedmann, 1982; Omelon, 2016; Walker and Pace, 2007). Em Marte, análogos poderiam ser encontrados no regolito, a camada de material particulado que cobre a superfície. Estudos indicam que esse regolito é rico em óxidos de ferro, como hematita e goethita (McSween and Keil, 2000), minerais identificados pela missão Opportunity (Christensen et al., 2001), conhecidos por sua capacidade de absorver e dispersar radiação UV, funcionando como filtros naturais (Cornell and Schwertmann, 2003; Mloszewska et al., 2018). A presença desses minerais sugere que refúgios ricos em ferro poderiam ter oferecido abrigo contra a radiação, favorecendo a vida microbiana.

Além da hematita, outros minerais como a jarosita também mostram forte capacidade de bloqueio UV, experimentos demonstram que uma camada de apenas 500 μM de jarosita impede quase toda transmissão de UV (Amaral et al., 2005). Esses resultados reforçam a ideia de que não apenas os óxidos, mas também sulfatos e cloretos férricos presentes no regolito, poderiam funcionar como escudo UV em Marte.

Nesse contexto, os íons férricos (Fe^{3+}) assumem um papel importante. Experimentos têm mostrado que microrganismos acidófilos, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, conseguem prosperar em condições ricas em ferro sob forte incidência de radiação (Bauermeister et al., 2014). Esse resultado ressalta que o ferro, em especial o Fe^{3+} , não é apenas um componente estrutural do regolito, mas pode também atuar como agente de proteção ao absorver ou dispersar a radiação UV incidente.

Além disso, a relevância da dessecação como estratégia de cessação parcial da atividade metabólica também é fundamental. Revisões recentes mostram que diversos microrganismos, incluindo arqueias, bactérias e fungos, podem sobreviver em estado dormente por longos períodos em condições dessecadas, retomando atividade após reidratação (Horne et al., 2022). Adicionalmente, isolamento de microrganismos em análogos antárticos revelou correlação quantitativa entre resistência à radiação e à dessecação, sugerindo que adaptações a um estresse conferem proteção contra outro (Musilova et al., 2015).

Microrganismos dessecados são, portanto, modelos particularmente adequados para simular condições marcianas. Alguns estudos espaciais como o experimento EXPOSE-R2 demonstraram que biofilmes secos de *Chroococcidiopsis* sobreviveram melhor sob fluência UV e radiação cósmica comparável à de Marte (Billi et al., 2019). Tais resultados apontam que estruturas multicelulares e o estado dessecado conferem maior proteção frente a ambientes extremos.

Apesar desses indícios, a maioria dos estudos realizados até o momento foca em microrganismos em condições hidratadas, seja em soluções ricas em ferro ou em matrizes minerais (Silva et al., 2024). Estudos baseados na lei de Beer–Lambert têm proposto modelos teóricos para descrever a fotoproteção conferida pelo Fe^{3+} em soluções aquosas, demonstrando que o aumento da concentração desse íon reduz significativamente a taxa de inativação microbiana sob radiação UV-C (Silva et al., 2024). No entanto, permanece uma lacuna no entendimento de como esses efeitos se traduzem em condições de dessecação.

O presente estudo busca preencher essa lacuna ao investigar experimentalmente a influência do Fe^{3+} na sobrevivência de microrganismos dessecados expostos à radiação UV-C e UV ambiental. A hipótese central é que a presença de Fe^{3+} , seja em solução durante a dessecação ou associado a partículas sólidas, funcione como um escudo capaz de ampliar a viabilidade celular sob condições simuladas do regolito marciano. Ao integrar experimentos laboratoriais com modelos preditivos, pretende-se não apenas avaliar a eficácia da fotoproteção conferida pelo Fe^{3+} , mas também fornecer parâmetros fundamentais para futuras simulações em missões espaciais e especialmente validar um experimento embarcado em um cubesat. Dessa forma, este trabalho contribui para a compreensão dos limites da vida em Marte e fortalece o arcabouço teórico sobre os fatores que podem ter sustentado a habitabilidade no planeta vermelho.

2 Materiais e Métodos

Todos os experimentos foram conduzidos em condições estéreis, utilizando capela de fluxo laminar, com meios e soluções preparados a partir de reagentes autoclavados a 121°C por 20 minutos ou esterilizados por filtração em membranas de 0.22 μm . Foram estudados quatro microrganismos: *Deinococcus radiodurans* (cepa R1), *Saccharomyces boulardii* (cepa 17), *Escherichia coli* (cepa K12 MG1655) e *Staphylococcus nepalensis* (cepa Tbe5 AM1E). Estes organismos foram escolhidos por apresentarem perfis de resistência a estresses ambientais, incluindo radiação, dessecação, acidez e salinidade. Para o cultivo utilizou-se meio TGY (Tryptona, Glicose e Extrato de Levedura) como base, exceto para *S. nepalensis*, que foi mantido em meio LB salino contendo 10 g/L de NaCl, pois foi constatado que ela crescia melhor nessas condições. As composições detalhadas dos meios encontram-se no Apêndice A.

Estoques de longo prazo foram preparados a partir de colônias isoladas cultivadas em meio líquido apropriado. Após crescimento em shaker a 30°C até a fase estacionária, alíquotas foram misturadas a glicerol estéril (20% v/v), submetidas a congelamento rápido em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Antes dos ensaios, culturas frescas foram obtidas por um esquema sequencial de pré-inóculos: inicialmente uma colônia isolada foi transferida para 3 mL de meio líquido e incubada por 24–48 h, dependendo do organismo; em seguida, 1% desse volume foi reinoculado em meio fresco, assegurando que as células estivessem em fase exponencial de crescimento no início do experimento.

O primeiro conjunto de ensaios avaliou a toxicidade do íon férrico (Fe^{3+}). Células em fase exponencial foram centrifugadas, lavadas em solução salina 0.9% e ressuspensas em volumes definidos. Suspensões foram então expostas a soluções contendo $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ em concentrações de 10 mM, previamente filtradas para esterilização. Em paralelo, controles foram mantidos apenas em solução salina. Após 30 minutos de incubação a 30°C sob agitação, alíquotas foram submetidas a diluições seriadas e plaqueamento em triplicata. A viabilidade relativa foi expressa como razão entre a concentração celular viável no tratamento (N) e no controle não tratado (N_0):

$$V = \frac{N}{N_0} \quad (1)$$

Com base nos resultados iniciais, *S. boulardii* foi selecionado como organismo modelo para os ensaios de dessecação. Três abordagens distintas foram testadas: secagem em sílica gel, liofilização e secagem sob fluxo laminar. A avaliação comparativa indicou que não houve perda significativa de viabilidade entre os métodos, de modo que a escolha foi orientada principalmente pela reprodutibilidade e simplicidade do procedimento.

Optou-se pela dessecação em fluxo laminar, pois além de ocorrer em ambiente estéril e com menor risco de contaminação, facilitou a ressuspensão do organismo após a dessecação e também permitiu a irradiação em fluxo laminar estéril. Inicialmente, a viabili-

dade pós-dessecação foi investigada por meio de plaqueamento quantitativo (UFC), entretanto, observou-se ausência de formação de colônias viáveis, o que impossibilitou análises estatísticas. Diante disso, os testes foram conduzidos de forma qualitativa, reidratando-se as amostras em meio líquido TGY e monitorando-se a turbidez por até seis dias como indicador de crescimento, medindo-se a densidade óptica do meio.

Em seguida, investigou-se a resposta de células dessecadas à radiação UV-C (254 nm). Para isso, múltiplos quadrados de Teflon contendo células previamente dessecadas na ausência de ferro foram expostos a fluências crescentes, medidas em tempo real com radiômetro calibrado. A fluência (F), em $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$, foi calculada como o produto da irradiância (I , em $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$) pelo tempo de exposição (t , em segundos):

$$F = I \cdot t \quad (2)$$

Após a irradiação, as células foram reidratadas em solução salina, ressuspensas e plaqueadas em TGY para quantificação de unidades formadoras de colônias. A sobrevivência relativa foi expressa como N/N_0 , em função da dose aplicada. Para ajustar as curvas de sobrevivência, utilizou-se um modelo log-logístico de dose-resposta:

$$V(x) = \frac{d}{1 + \left(\frac{x}{LD_{50}}\right)^b} \quad (3)$$

onde x é a dose de radiação, LD_{50} é a dose letal mediana, b é o coeficiente de inclinação e $d = 1$ corresponde à viabilidade inicial normalizada.

A influência do ferro sobre a fotoproteção celular foi modelada pela Lei de Beer–Lambert. A transmitância (T) da radiação ao atravessar uma solução é dada por:

$$T = 10^{-\varepsilon lc} \quad (4)$$

onde ε é o coeficiente de extinção molar do Fe^{3+} em 254 nm ($2.40 \pm 0.01 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), l é o caminho óptico (cm) e c é a concentração do íon ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Considerando que a viabilidade depende da fração de radiação efetivamente transmitida até as células, a dose letal ajustada na presença de ferro ($LD_{50,f}$) pode ser estimada a partir da dose em ausência de ferro ($LD_{50,i}$) como:

$$LD_{50,f} = \frac{LD_{50,i}}{T} \quad (5)$$

A ideia inicial era utilizar essa formulação para comparar os resultados obtidos com aqueles reportados em Silva et al. (2024), isolando o efeito óptico do ferro de outros potenciais mecanismos de tolerância celular. Entretanto, verificou-se que a dessecação na presença de ferro foi altamente tóxica e levou à morte completa das células, impossibilitando a aplicação prática desse modelo comparativo.

Todas as análises foram realizadas em *Python*, utilizando as bibliotecas `pandas`, `scipy.stats` e `lmfit`. Ajustes de curvas foram avaliados por mínimos quadrados não lineares e intervalos de confiança de 95% foram obtidos por reamostragem bootstrap com semente fixa para reprodutibilidade. A descrição detalhada de todos os protocolos experimentais se encontra no Apêndice B.

3 Resultados

3.1 Resistência a FeCl_3

Quatro microrganismos foram avaliados quanto à sobrevivência após exposição única a 10 mM de FeCl_3 . Em três espécies (*E. coli*, *S. nepalensis*, *D. radiodurans*) não houve crescimento pós-tratamento (todas as placas sem colônias), enquanto *Saccharomyces boulardii* manteve certa viabilidade. A Tabela 1 resume as médias (\log_{10} CFU/mL) e a redução mínima inferida (limite inferior; “>” indica valor censurado pela ausência total de colônias acima do limite de detecção).

Tabela 1: Teste de resistência a 10 mM FeCl_3 . Reduções expressas em \log_{10} . Para espécies sem crescimento no tratamento, a redução é um limite inferior (baseada em controle – LD). LD: limite de detecção (\log_{10} CFU/mL).

Organismo	n (rep)	Controle (\log_{10} CFU/mL)	Redução (\log_{10})	LD
<i>E. coli</i>	3	8.68	> 6.68	2.00
<i>S. nepalensis</i>	3	8.84	> 6.84	2.00
<i>D. radiodurans</i>	3	7.72	> 5.72	2.00
<i>S. boulardii</i>	3	8.42	1.51	5.00

Para *S. boulardii*, a viabilidade relativa (tratado/controle) foi de 3.12% (IC_{95%}: 2.88–3.36%). Esse resultado levou a escolha da *S. boulardii* como organismo modelo para experimentos subsequentes de dessecação e irradiação.

3.2 Avaliação de Métodos de Dessecação

Antes de padronizar o procedimento de dessecação para os ensaios de irradiação, foi realizado um teste exploratório (sem replicatas experimentais) comparando três formas de dessecação, liofilização, dessecação em sílica e dessecação em fluxo laminar sobre lâmina de Teflon. O objetivo era detectar grandes discrepâncias de sobrevivência. Portanto, não foram conduzidas análises estatísticas formais.

As contagens de colônias (triplicatas de gotas em uma mesma diluição) e as diluições usadas estão na Tabela 2. Como o controle não dessecado foi plaqueado em 10^{-5} enquanto

os métodos dessecados em 10^{-4} , uma estimativa aproximada de sobrevivência relativa (S_{rel}) foi obtida por:

$$S_{\text{rel}} \approx \frac{\overline{C}_{\text{método}}}{\overline{C}_{\text{controle}}} \times 10^{(d_{\text{controle}} - d_{\text{método}})},$$

onde \overline{C} é a média das contagens e d é o expoente positivo da diluição (10^{-d}). Assim, a diferença de um log na diluição (controle em 10^{-5} vs. tratamentos em 10^{-4}) introduz o fator 10^{-1} na estimativa.

Tabela 2: Teste preliminar (único) de métodos de dessecação para *S. bouldardii*. Pseudo-replicatas: três gotas na mesma placa e diluição. S_{rel} é uma estimativa aproximada conforme descrito no texto.

Método	Diluição	Contagens	Média (gota)	S_{rel} (aprox.)
Controle não dessecado	10^{-5}	25, 29, 26	26.67	1.00 (referência)
Liofilização	10^{-4}	20, 23, 21	21.33	0.08
Sílica	10^{-4}	56, 52, 56	54.67	0.21
Fluxo + Teflon	10^{-4}	51, 50, 44	48.33	0.18

Os três métodos de dessecação produziram ordens de grandeza de sobrevivência semelhantes (diferenças dentro do que seria plausível por variação experimental em um único ensaio). A sílica e o Teflon apresentaram estimativas próximas (≈ 18 – 21% do controle), enquanto a liofilização mostrou redução um pouco maior ($\approx 8\%$). Dada a equivalência prática observada e considerando:

1. menor risco de contaminação (superfície exposta controlada no fluxo laminar),
2. facilidade e rapidez de ressuspensão homogênea do material dessecado,
3. compatibilidade geométrica com irradiação subsequente e manipulação padronizada,

foi escolhido o método de dessecação em fluxo laminar sobre lâmina de Teflon para todos os experimentos posteriores.

É importante notar que os valores desta etapa têm caráter apenas decisório e não devem ser interpretados como estimativas inferenciais de sobrevivência entre métodos de dessecação.

3.3 Dessecação na Presença de Ferro

Este ensaio teve caráter qualitativo. A intenção inicial era quantificar a sobrevivência de *S. bouldardii* dessecada na presença de FeCl_3 (0.5, 5 e 10 mM) comparando-a ao controle em salina, porém nas tentativas de plaqueamento das condições com ferro nenhuma colônia

(UFC) foi observada em qualquer diluição. Dado que todos os valores ficaram abaixo do limite de detecção, não foi possível estimar proporções de sobrevivência nem aplicar métodos quantitativos ou intervalos de confiança; qualquer cálculo resultaria apenas em limites inferiores.

Optou-se, portanto, por registrar apenas a recuperação (crescimento / ausência de crescimento após 6 dias de incubação em meio líquido). Apenas o controle (0 mM) apresentou turbidez; todas as concentrações contendo FeCl_3 permaneceram límpidas, indicando ausência de viabilidade detectável sob as condições utilizadas (Tabela 3). Não foram conduzidos testes estatísticos (ex. Fisher) nesta versão porque não há contagens numéricas, apenas ausência completa de crescimento nas condições tratadas, o que já fornece evidência de efeito sinérgico letal ferro + dessecação.

Tabela 3: Avaliação qualitativa da recuperação pós-dessecação de *S. bouldardii* na presença de FeCl_3 . Observação após 6 dias em meio líquido.

Condição	0 mM	0.5 mM	5 mM	10 mM
Turbidez	Sim	Não	Não	Não

A ausência absoluta de crescimento em qualquer concentração de ferro justificou prosseguir apenas com a condição controle (salina) nos ensaios de irradiação UV-C.

3.4 Resistência a UV-C em Células Dessecadas

A exposição de células dessecadas de *S. bouldardii* à radiação UV-C (254 nm) resultou em uma curva de sobrevivência não linear, caracterizada por uma queda acentuada da viabilidade nas doses iniciais, seguida por uma “cauda” persistente em doses mais elevadas (Figura 1). Esse formato é típico de populações heterogêneas, em que a maioria das células é rapidamente inativada, mas uma fração minoritária resiste por mais tempo.

A análise estatística confirmou o forte impacto da dose de radiação sobre a viabilidade celular ($p \ll 0.001$). Quando os dados foram ajustados a um modelo log-linear simples (cinética de primeira ordem), foi possível estimar dois parâmetros clássicos de resistência: o D_{10} , que corresponde à dose necessária para reduzir a população em 90% (neste caso $\sim 525 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$), e o LD_{50} , que representa a dose que elimina metade das células ($\sim 158 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$). Esses valores indicam uma sensibilidade intermediária de *S. bouldardii* em comparação a outros microrganismos relatados na literatura. Contudo, a qualidade do ajuste foi insatisfatória, revelando que o modelo linear não descreve bem o comportamento experimental.

A comparação entre modelos estatísticos mostrou que a cinética bifásica descreve os dados de forma muito mais adequada. Nesse cenário, cerca de 98% das células pertencem a uma subpopulação altamente sensível, inativada rapidamente (constante k_1 elevada),

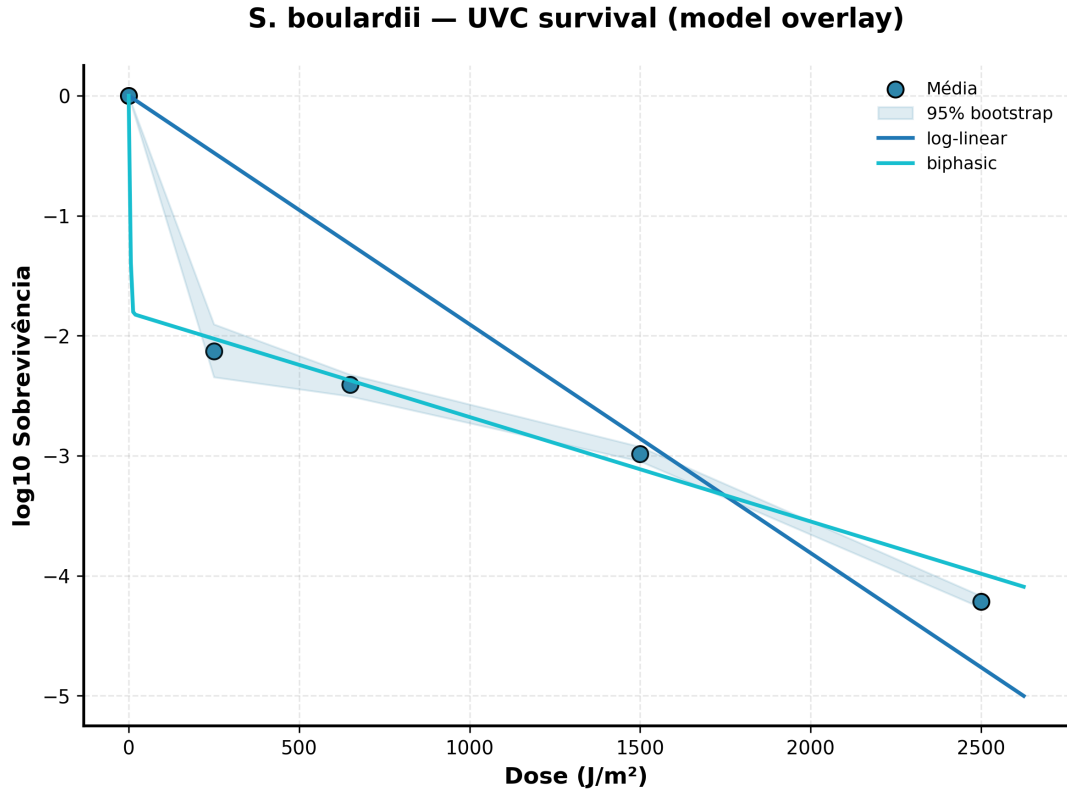


Figura 1: Curva de sobrevivência de *S. boulardii* dessecada sob irradiação UV-C. Pontos: médias experimentais em escala log10; área sombreada: intervalo de confiança de 95% (bootstrap); linhas: ajustes dos modelos log-linear (azul escuro) e bifásico (ciano).

enquanto aproximadamente 1–2% compõem uma fração muito mais resistente (constante k_2 baixa), responsável pela cauda observada. Em termos práticos, isso significa que mesmo após doses elevadas de UV-C, uma pequena fração de células consegue sobreviver, potencialmente representando um desafio para completa inativação.

Por fim, a análise das contagens brutas revelou uma variabilidade maior do que a esperada para um processo puramente aleatório (superdispersão), reforçando a ideia de que a população não é homogênea. Modelos estatísticos que levam essa heterogeneidade em conta (como o Binomial Negativo) foram muito mais adequados do que o modelo de Poisson.

Em conjunto, esses resultados mostram que células dessecadas de *S. boulardii* são, em sua maioria, sensíveis à radiação UV-C, mas contêm uma subpopulação resistente que sustenta a sobrevivência mesmo sob doses muito altas. Essa característica pode ter implicações tanto na eficiência de processos de descontaminação quanto na persistência da levedura em ambientes extremos.

Estudos com organismos radioresistentes, como *Deinococcus radiodurans*, mostram que a capacidade de sobreviver a UV-C está frequentemente associada à resistência simultânea à dessecação e ao estresse oxidativo Polleto et al. (2024). Embora *S. boulardii* não atinja níveis de tolerância comparáveis, a presença da fração resistente observada

aqui é consistente com esse padrão e sugere mecanismos de proteção em subpopulações específicas. Todos os resultados experimentais podem ser vistos com mais detalhes no Apêndice C.

4 Discussão

Os resultados obtidos neste estudo revelam efeitos do íon férrico (Fe^{3+}) sobre a sobrevivência da levedura *Saccharomyces boulardii* dessecada sob radiação UV-C. Em condições aquosas, a adição de Fe^{3+} apresentou um efeito protetor contra a radiação UV, devido a propriedades de atenuação ou filtração ultravioleta por complexos férricos (Silva et al., 2024). Por exemplo, observou-se que concentrações elevadas de óxidos de ferro em suspensão conferem blindagem física à radiação UV em sistemas aquosos, de modo que aumentos de ferro em solução reduzem a dose UV incidente. Esta proteção pode ser atribuída à forte absorbância de UV pelos complexos de Fe^{3+} (como o FeCl_3 ou óxidos férricos), que funciona como uma espécie de “filtro” UV, além de possíveis interações antioxidantes em meio líquido. Nesse sentido, Silva et al. (2024) relataram em estudos prévios que Fe^{3+} em solução aquosa aumentava a sobrevivência de microrganismos expostos à UV, o que foi atribuído a essa atenuação da radiação.

Entretanto, quando as células foram dessecadas, o experimento mostrou que a presença de Fe^{3+} tornou-se tóxica, contrariando o efeito protetor observado em meio aquoso. Em condições dessecadas, as membranas celulares apresentam baixa hidratação e há menos tamponamento de radicais, de modo que o Fe^{3+} livre pode atuar como potente agente oxidante. De fato, sabe-se que íons de ferro podem participar de reações tipo Fenton, qualquer traço de peróxido de hidrogênio residual ou gerado por foto-ativação pode ser convertido em radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) extremamente reativos em presença de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. A literatura reporta que a exposição de células a íon férrico e outras fontes oxidantes leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e subsequente dano oxidativo a biomoléculas. Esses radicais atacam nucleotídeos, proteínas e lipídeos, promovendo mutações, desnaturação proteica e peroxidação lipídica (Kochevar, 1990; Kulms and Schwarz, 2000; Rastogi et al., 2010).

A radiação UV-C por si só causa danos diretos e indiretos às células. Ela induz quebras de fitas de DNA e formação de dímeros de timina e também gera ROS ao interagir com moléculas de água ou cromóforos celulares (Rastogi et al., 2010). Rothschild and Mancinelli (2001) ressaltam que o efeito mais grave da radiação UV e ionizante é a degradação dos ácidos nucleicos, tanto por dano direto quanto mediado por ROS que criam bases modificadas e quebras de fita simples e dupla no DNA. Além disso, as espécies reativas de oxigênio resultantes atacam também membranas e proteínas celulares, comprometendo a integridade dos fosfolipídeos da membrana e levando à inativação enzimática e desnaturação proteica. Em organismos resistentes, há mecanismos de reparo e antioxidantes

eficientes para mitigar esses efeitos. Dentre eles, *Deinococcus radiodurans* é capaz de sobreviver a dezenas de milhares de Gy de radiação gama e a doses de UV-C muito elevadas. Cox and Battista (2005) destacam que *D. radiodurans* possui uma capacidade de reparar centenas de quebras de fita dupla de DNA induzidas por radiação, resultado de estratégias passivas (como vários genomas redundantes e organização cromossômica compacta) e ativas (vários caminhos de recombinação e reparo). Curiosamente, essa resistência é considerada um subproduto de sua tolerância à dessecação, ambientes secos selecionaram mecanismos que protegem o DNA de degradação e permitem a eficiente reparação do material genético (Cox and Battista, 2005; Rothschild and Mancinelli, 2001).

No caso da levedura dessecada, presume-se que ela não possua esses mesmos sistemas de proteção tão refinados. A desidratação acentuada desloca as cadeias de água e pode favorecer a circulação de elétrons entre o ferro férrico e componentes celulares, aumentando a produção de radicais. Além disso, condições de baixa água intensificam o estresse oxidativo interno, já que as barreiras físicas podem falhar. Polleto et al. (2024) ilustram outro contexto semelhante, em um ambiente rico em radiação (minerais uraníferos), bactérias isoladas exibiram resistência UV comparável à de *D. radiodurans*, destacando a importância de sistemas antioxidantes potentes em microrganismos adaptados a tensões combinadas de radiação e tóxicos. Na literatura, por exemplo, também se sabe que esporos de *Bacillus* são altamente tolerantes à UV devido à presença de ácido dipicolínico e outras proteções, mas leveduras convencionais geralmente são significativamente mais sensíveis ao dano UV e oxidativo.

Em síntese, os achados desse trabalho indicam que o efeito benéfico do Fe^{3+} observado em solução aquosa não se traduz em ambientes secos. Em água, Fe^{3+} pode agir como um fotoprotetor físico-químico, enquanto na fase sólida age como agente promotor de estresse oxidativo. Este contraste destaca a relevância do papel da água no modulador das reações de ferro, a presença de solvente aquoso pode estabilizar feixes de elétrons e diluir radicais, ao passo que sua ausência concentra reativos de forma letal. Essa interpretação é reforçada pela literatura sobre reatividade do ferro, em presença de peróxido de hidrogênio, há um delicado equilíbrio entre os efeitos protetores do ferro (bloqueio UV) e os deletérios (reações foto-Fenton) (Amaral et al., 2005; Mloszewska et al., 2018). Num contexto seco, mesmo baixos níveis de peróxido gerados pela luz UV ou por outras fontes poderiam induzir formação de $\cdot\text{OH}$ via ferro, causando danos irreversíveis às biomoléculas.

As implicações dos resultados alcançam o domínio da astrobiologia. Marte, em particular, oferece um exemplo extremo de habitat seco, frio e bombardeado por UV. O planeta vermelho carece de uma camada de ozônio significativa e tem uma atmosfera quase inexistente, resultando em fluxos UV muito elevados sobre a superfície. Cockell et al. (2000); Patel et al. (2002); Rontó et al. (2003) modelaram o ambiente UV marciano e concluíram que a irradiância UV atual em Marte é várias vezes maior que na Terra, o que representa um obstáculo significativo para qualquer biota não adaptada, sendo

capaz de esterilizar rapidamente microrganismos expostos. Assim, vida marciana na superfície exigiria abrigos físicos (e.g. debaixo de rochas ou solo) ou adaptações extremas de resistência à radiação.

O solo marciano é também rico em ferro, principalmente sob a forma de óxidos (hematita, magnetita etc.). Esse ferro tanto pode proteger quanto pode prejudicar potenciais formas de vida. Em sistemas análogos à Marte, altas concentrações de partículas férricas promovem bloqueio eficaz de UV, mas quando combinadas com oxidantes ativados pela luz desencadeiam intensas reações foto-Fenton que geram radicais tóxicos e aumentam a letalidade (Amaral et al., 2005; Christensen et al., 2001). Em outras palavras, os efeitos combinados de múltiplos componentes do regolito, ativados pela fotoquímica superficial, tornam a superfície presente muito menos habitável do que se pensava. Esses achados destacam que, assim como na nossa levedura dessecada, o ferro marciano (e seus compostos reativos) pode intensificar danos radiativos via geração de ROS.

Adicionalmente, o regolito marciano contém percloratos, que sob UV formam agentes oxidantes ainda mais agressivos (Cockell, 2000). Tais compostos, aliados à radiação UV e ao ferro do solo, constituem um ambiente extremamente hostil. Nossos resultados demonstram que mesmo um eucarioto relativamente resistente como *S. boulardii* não sobreviveria nas condições combinadas de dessecação, radiação UV-C e ferro sem proteção adicional. Isso reforça a visão de que, na superfície de Marte, apenas nichos fortemente protegidos (subterrâneos, endolíticos ou em lagos perenes com baixa concentração de íons férricos) poderiam sustentar formas de vida terrestres conhecidas. Em suma, a habitabilidade da superfície marciana está precariamente equilibrada entre as vantagens e desvantagens trazidas pelo ferro, e nossa experiência empírica com *S. boulardii* ilustra os limites estreitos da vida nesses extremos.

Finalmente, esta discussão reforça a noção de que a dessecação pode conferir alguma tolerância à radiação. Rothschild and Mancinelli (2001) já apontaram que onde há água, há vida, mas também que extremos que combinam estresse oxidativo e radiação (como ambientes áridos terrestres) selecionam microrganismos com sistemas antioxidantes eficazes. Em regiões desérticas da Terra, tem-se observado bactérias altamente resistentes à radiação justamente porque sobrevivem em condições secas e irradiadas (Billi et al., 2019; Musilova et al., 2015). Porém, mesmo elas dependem de mecanismos biológicos como reparo eficiente de DNA e antioxidantes. Assim, esses achados contribuem para delimitar ainda mais os limites da vida, eles indicam que ambientes extremos não são universalmente resolvíveis por qualquer microrganismo, mas sim reprodutores de pressões seletivas específicas que somente certos extremófilos superam.

Em suma, a comparação entre nossos resultados e a literatura evidencia que o papel do Fe^{3+} depende criticamente do contexto. Conforme Silva et al. (2024) e Amaral et al. (2005), em solução aquosa o ferro pode atenuar a radiação UV, porém em condições de dessecação ele atua como “catalisador” de processos oxidativos danosos. Os mecanis-

mos envolvidos, danos diretos de UV ao DNA e danos indiretos via ROS (Kulms and Schwarz, 2000; Rastogi et al., 2010) acrescidos da reatividade férrica, explicam a mortalidade observada. Portanto, o que foi mostrado aqui têm implicações importantes para a astrobiologia, sugerem que a habitabilidade de Marte, especialmente nas zonas ricas em ferro do regolito, dependeria de fatores como penetração de UV, presença de oxidantes e disponibilidade de água. Conhecer como organismos simples reagem a essas combinações extremas ajuda a refinar modelos de sobrevivência extraterrestre e a estabelecer estratégias de busca por vida, mostrando que a vida marciana, se existir, deve operar dentro de margens adaptativas muito específicas.

5 Conclusões e Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que, ao contrário do efeito fotoprotetor observado em soluções aquosas, a presença de íons férricos (Fe^{3+}) em condições dessecadas resultou em acentuada toxicidade celular. A levedura *Saccharomyces boulardii*, utilizada como organismo modelo, apresentou mortalidade quase completa quando submetida à dessecação na presença de ferro, sugerindo que a reatividade do Fe^{3+} em ambientes com baixa disponibilidade de água desempenha um papel crítico na intensificação do estresse oxidativo. Esse achado ressalta a importância do contexto físico-químico na determinação do papel do ferro, em meio líquido, pode atuar como barreira contra radiação ultravioleta, enquanto em ambientes secos torna-se um catalisador de reações deletérias, promovendo danos irreversíveis a biomoléculas.

Esses resultados possuem implicações relevantes para a astrobiologia e para a avaliação da habitabilidade em Marte. A alta abundância de ferro em seu regolito pode, simultaneamente, oferecer proteção contra radiação UV e, em ambientes áridos, favorecer reações oxidativas letais para organismos expostos. Assim, a sobrevivência microbiana em cenários marcianos provavelmente dependeria de nichos protegidos, associados à presença de água ou a microambientes minerais específicos.

Como perspectivas futuras, destaca-se a necessidade de investigar em maior detalhe os mecanismos bioquímicos responsáveis pela elevada mortalidade observada na combinação de ferro e dessecação. Compreender como o Fe^{3+} intensifica a formação de espécies reativas de oxigênio e quais alvos celulares são mais vulneráveis permitirá esclarecer se o efeito resulta principalmente de reações foto-Fenton, da alteração estrutural de membranas e proteínas ou de falhas nos sistemas de reparo do DNA. Além disso, torna-se relevante avaliar se o fenômeno observado em *S. boulardii* se reproduz em organismos conhecidos por sua resistência extrema, como arqueias halofílicas ou *Acidithiobacillus ferrooxidans*, o que ajudaria a determinar se o efeito tóxico do ferro é generalizável ou restrito a certos grupos. Outra perspectiva importante é a realização de experimentos em condições mais próximas às ambientais de Marte, incorporando minerais do regolito e variações de umi-

dade residual, de forma a reproduzir de maneira mais realista os processos fotoquímicos e oxidativos que podem ocorrer na superfície do planeta. Dessa forma, será possível avançar tanto na compreensão dos limites da vida em ambientes extremos quanto na avaliação de potenciais nichos habitáveis no contexto marciano.

Referências

- Amaral, G., Martinez-Frias, J., and Vázquez, L. (2005). Astrobiological significance of minerals on mars surface environment: Uv-shielding properties of fe (jarosite) vs. ca (gypsum) sulphates.
- Ball, N., Kagawa, H., Hindupur, A., and Hogan, J. A. (2017). Development of storage methods for saccharomyces strains to be utilized for in situ nutrient production in long-duration space missions. In *International Conference on Environmental Systems*, number ARC-E-DAA-TN39871. Inc.
- Bauermeister, A., Rettberg, P., and Flemming, H. C. (2014). Growth of the acidophilic iron-sulfur bacterium acidithiobacillus ferrooxidans under mars-like geochemical conditions. *Planetary and Space Science*, 98:205–215.
- Billi, D., Staibano, C., Verseux, C., Fagliarone, C., Mosca, C., Baqué, M., Rabbow, E., and Rettberg, P. (2019). Dried biofilms of desert strains of chroococciopsis survived prolonged exposure to space and mars-like conditions in low earth orbit. *Astrobiology*, 19(8):1008–1017.
- Carr, M. H. and Head, J. W. (2010). Geologic history of mars. *Earth and Planetary Science Letters*, 294(3–4):185–203.
- Christensen, P. R., Bandfield, J. L., Hamilton, V. E., Ruff, S. W., Kieffer, H. H., Titus, T. N., Malin, M. C., Morris, R. V., Lane, M. D., Clark, R., et al. (2001). Mars global surveyor thermal emission spectrometer experiment: investigation description and surface science results. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 106(E10):23823–23871.
- Cockell, C. S. (2000). The ultraviolet history of the terrestrial planets—implications for biological evolution. *Planetary and Space Science*, 48(2–3):203–214.
- Cockell, C. S., Catling, D. C., Davis, W. L., Snook, K., Kepner, R. L., Lee, P., and McKay, C. P. (2000). The ultraviolet environment of mars: biological implications past, present, and future. *Icarus*, 146(2):343–359.
- Cornell, R. M. and Schwertmann, U. (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses*, volume 664. Wiley-VCH.
- Cox, M. M. and Battista, J. R. (2005). Deinococcus radiodurans—the consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11):882–892.
- Diaz, B. and Schulze-Makuch, D. (2006). Microbial survival rates of escherichia coli and deinococcus radiodurans under low temperature, low pressure, and uv-irradiation conditions, and their relevance to possible martian life. *Astrobiology*, 6(2):332–347.

- Domagal-Goldman, S. D., Wright, K. E., Adamala, K., De La Rubia, L. A., Bond, J., Dartnell, L. R., and Wong, T. (2016). The astrobiology primer v2. 0. *Astrobiology*, 16(8):561.
- Friedmann, E. I. (1982). Endolithic microorganisms and their habitats. *Science*, 215(4536):1045–1053.
- Galante, D., Silva, E. P. D., Rodrigues, F., Horvath, J. E., and Avellar, M. G. B. D. (2016). *Astrobiologia: uma ciência emergente*. Tiknet.
- Horne, W. H., Volpe, R. P., Korza, G., DePratti, S., Conze, I. H., Shuryak, I., Grebenc, T., Matrosova, V. Y., Gaidamakova, E. K., Tkavc, R., et al. (2022). Effects of desiccation and freezing on microbial ionizing radiation survivability: considerations for mars sample return. *Astrobiology*, 22(11):1337–1350.
- Kochevar, I. E. (1990). Uv-induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. *Photochemistry and Photobiology*, 52(4):795–800.
- Kulms, D. and Schwarz, T. (2000). Molecular mechanisms of uv-induced apoptosis. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine: Review article*, 16(5):195–201.
- McSween, H. Y. and Keil, K. (2000). Mixing relationships in the martian regolith and the composition of globally homogeneous dust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(12):2155–2166.
- Mloszewska, A. M., Cole, D. B., Planavsky, N. J., Kappler, A., Whitford, D. S., Owttrim, G. W., and Konhauser, K. (2018). Uv radiation limited the expansion of cyanobacteria in early marine photic environments. *Nature Communications*, 9(1):1–8.
- Musilova, M., Wright, G., Ward, J. M., and Dartnell, L. R. (2015). Isolation of radiation-resistant bacteria from mars analog antarctic dry valleys by preselection, and the correlation between radiation and desiccation resistance. *Astrobiology*, 15(12):1076–1090.
- Nweke, C. O. and Ogbonna, C. J. (2017). Statistical models for biphasic dose-response relationships (hormesis) in toxicological studies. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 12(1):39–55.
- Omelon, C. R. (2016). Endolithic microbial communities in polar desert habitats. *Geomicrobiology Journal*, 33(3–4):193–200.
- Patel, M. R., Zarnecki, J. C., and Catling, D. C. (2002). Ultraviolet radiation on the surface of mars and the beagle 2 uv sensor. *Planetary and Space Science*, 50(9):915–927.

- Polleto, B., Silva, G., Souza Ramos de Carvalho, A., Vincenzi, R., de Almeida, E., Galante, D., Bendia, A., and Rodrigues, F. (2024). Ultraviolet and desiccation resistance of microorganisms isolated from uranium-rich minerals from perus, brazil. *Astrobiology*.
- Pulschen, A. A., de Araujo, G. G., de Carvalho, A. C. S. R., Cerini, M. F., Fonseca, L. D. M., Galante, D., and Rodrigues, F. (2018). Survival of extremophilic yeasts in the stratospheric environment during balloon flights and in laboratory simulations. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(23):e01942–18.
- Pulschen, A. A., Rodrigues, F., Duarte, R. T., Araujo, G. G., Santiago, I. F., Paulino-Lima, I. G., and Galante, D. (2015). Uv-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the atacama desert as eukaryotic models for astrobiology. *Microbiologyopen*, 4(4):574–588.
- Rastogi, R. P., Kumar, A., Tyagi, M. B., and Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced dna damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*.
- Rontó, G., Bérces, A., Lammer, H., Cockell, C. S., Molina-Cuberos, G. J., Patel, M. R., and Selsis, F. (2003). Solar uv irradiation conditions on the surface of mars. *Photochemistry and Photobiology*, 77(1):34–40.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823):1092–1101.
- Silva, G. G., Schiavo, A. P. M., Silva, I. E., Binelli, L., and Rodrigues, F. (2024). Uv-c photoprotection by ferric ions and the consequences on the habitability of ancient mars. Em fase de elaboração.
- Wadsworth, J. and Cockell, C. S. (2017a). The janus face of iron on anoxic worlds: iron oxides are both protective and destructive to life on the early earth and present-day mars. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5):fix056.
- Wadsworth, J. and Cockell, C. S. (2017b). Perchlorates on mars enhance the bacteriocidal effects of uv light. *Scientific reports*, 7(1):4662.
- Walker, J. J. and Pace, N. R. (2007). Endolithic microbial ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 61:331–347.

A Receitas Utilizadas

Esta seção detalha a composição e o método de preparo de todos os meios de cultura e soluções utilizados nos experimentos.

Meio TGY Líquido (Tryptone Glucose Yeast Extract)

- Triptona: 5 g/L
- Extrato de levedura: 3 g/L
- Glicose: 1 g/L
- Água destilada: q.s.p. 1 L

Preparo: Dissolver todos os componentes em água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Meio TGY Ágar

- Triptona: 5 g/L
- Extrato de levedura: 3 g/L
- Glicose: 1 g/L
- Ágar: 15 g/L
- Água destilada: q.s.p. 1 L

Preparo: Dissolver todos os componentes em água destilada, aquecer até a completa dissolução do ágar e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Verter em placas de Petri estéreis em ambiente asséptico (fluxo laminar).

Meio LB Salino

- Triptona: 5 g/L
- Extrato de levedura: 3 g/L
- Glicose: 1 g/L
- Cloreto de Sódio (NaCl): 10 g/L
- Água destilada: q.s.p. 1 L

Preparo: Dissolver todos os componentes em água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Meio LB Salino Ágar

- Triptona: 5 g/L
- Extrato de levedura: 3 g/L
- Glicose: 1 g/L
- Cloreto de Sódio (NaCl): 10 g/L
- Ágar: 15 g/L
- Água destilada: q.s.p. 1 L

Preparo: Dissolver todos os componentes em água destilada, aquecer até a completa dissolução do ágar e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Solução Salina 0,9% NaCl

- Cloreto de Sódio (NaCl): 0,9 g
- Água destilada: q.s.p. 100 mL

Preparo: Dissolver o NaCl em água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Solução Estoque de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mM em Solução Salina 0,9%

Cálculo da massa (para 10 mL):

- Massa Molar do $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 270.3 g/mol
- Concentração desejada: 10 mM (0.01 mol/L)
- Volume final: 10 mL (0.01 L)
- **Cálculo:** $\text{Massa} = 0.01 \text{ mol/L} \times 0.01 \text{ L} \times 270.3 \text{ g/mol} = 0.02703 \text{ g} = \mathbf{27.03 \text{ mg}}$

Ingredientes:

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 27,03 mg
- Solução Salina 0,9%: 10 mL

Procedimento:

1. Em condições assépticas, pesar 27,03 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
2. Dissolver o sal em 10 mL de solução salina 0,9% estéril.
3. Esterilizar a solução por filtração utilizando um filtro de membrana com poros de 0,22 μm .

Solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM em Solução Salina 0,9%

Procedimento:

1. Em condições assépticas, diluir 5 mL da solução estoque de FeCl_3 10 mM em 5 mL de solução salina 0,9% estéril.
2. Homogeneizar a solução para obter uma concentração final de 5 mM.

Solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM em Solução Salina 0,9%

Procedimento:

1. Em condições assépticas, diluir 1 mL da solução estoque de FeCl_3 10 mM em 9 mL de solução salina 0,9% estéril.
2. Homogeneizar a solução para obter uma concentração final de 0,5 mM.

B Protocolos Experimentais

Esta seção descreve em detalhes os procedimentos executados durante os experimentos.

B.1 Obtenção e Estoque de Culturas

Preparo do Inóculo Inicial

1. Uma alçada de cada cultura estoque (plaqueada ou congelada) foi inoculada em placas de Petri contendo meio TGY Ágar.
2. As placas foram incubadas a 30°C por 24-48 horas, até o crescimento de colônias isoladas.
3. Estas placas foram utilizadas como fonte para os pré-inóculos dos experimentos.

Preparo do Estoque Criopreservado em Glicerol

Materiais:

- Culturas líquidas dos microrganismos (crescidas por 48h em TGY líquido).
- Glicerol estéril a 80% (v/v).
- Criotubos estéreis de 1,5 mL.
- Nitrogênio líquido.
- Caixa de criopreservação e freezer -80°C.

Procedimento:

1. Em uma capela de fluxo laminar, adicionar 800 µL da cultura líquida em fase estacionária a um criotubo estéril.
2. Adicionar 200 µL de glicerol estéril a 80% ao criotubo, resultando em uma concentração final de 20% de glicerol.
3. Homogeneizar a suspensão por inversão suave, evitando a formação de vórtice.
4. Identificar os criotubos com nome do organismo, data e concentração de glicerol.
5. Realizar o congelamento rápido (*snap-freezing*) imergindo os tubos em nitrogênio líquido por aproximadamente 5 minutos.
6. Transferir os criotubos para uma caixa de criopreservação e armazenar em freezer a -80°C.

B.2 Ensaio de Resistência a FeCl_3

Preparo dos Inóculos

1. Transferir uma colônia isolada de cada microrganismo para um tubo Falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio TGY líquido.
2. Incubar em agitador orbital (*shaker*) a 30°C e 150 rpm por 24 horas (para *E. coli* e *S. nepalensis*) ou 48 horas (para *D. radiodurans* e *S. boulardii*) para obter o pré-inóculo.
3. Inocular 30 μL do pré-inóculo em um novo tubo Falcon com 3 mL de meio TGY (diluição 1:100).
4. Incubar novamente sob as mesmas condições para obter uma cultura em fase exponencial tardia/estacionária inicial.

Lavagem Celular e Exposição ao Fe^{3+}

Materiais:

- Culturas líquidas.
- Solução salina 0,9% estéril.
- Solução de FeCl_3 10 mM em salina estéril.
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL.

Procedimento:

1. Transferir a cultura para tubos de 15 mL e centrifugar a 8.000 rpm por 10 minutos.
2. Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* celular em 3 mL de solução salina. Repetir este passo de lavagem mais duas vezes.
3. Após a última lavagem, ressuspender o *pellet* final no volume original de salina.
4. Distribuir 800 μL da suspensão celular lavada em dois tubos Eppendorf: um para o controle (C+) e outro para o tratamento (Fe^{3+}).
5. Centrifugar os tubos a 8.000 rpm por 5 minutos e descartar o sobrenadante.
6. Ressuspender o *pellet* do tubo C+ em 800 μL de solução salina 0,9%.
7. Ressuspender o *pellet* do tubo Fe^{3+} em 800 μL de solução de FeCl_3 10 mM.
8. Incubar ambos os tubos em agitador a 150 rpm e 30°C por 30 minutos.

Diluição Seriada e Plaqueamento

1. Após a incubação, realizar uma diluição seriada (1:10) para cada amostra (C+ e Fe^{3+}), utilizando solução salina 0,9% como diluente. As diluições finais variaram de 10^{-3} a 10^{-6} , dependendo do organismo.
2. Plaquear, em triplicata, alíquotas de 10 μL de cada diluição apropriada em placas de TGY Ágar (método de *spot plating*).
3. Incubar as placas a 30°C por 24-48 horas.
4. Realizar a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nas gotas correspondentes às diluições que apresentaram entre 30 e 300 colônias.

B.3 Ensaio de Resistência à Dessecação

Este protocolo foi executado para comparar a viabilidade de *Saccharomyces boulardii* após a dessecação por três métodos distintos (liofilização, sílica gel e fluxo de ar), utilizando uma amostra não dessecada como controle. Conforme anotado no caderno de laboratório, este protocolo foi substituído pelo ensaio de irradiação, mas seus passos são detalhados aqui para fins de registro.

Preparo do Inóculo e Lavagem Celular

1. Uma cultura de *S. boulardii* foi crescida em meio TGY líquido por 24 horas a 30°C e 150 rpm.
2. A cultura foi transferida para tubos Falcon de 15 mL e centrifugada a 12.857 rcf (10.000 rpm) por 10 minutos.
3. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* celular foi ressuspenso em 3 mL de solução salina 0,9% estéril.
4. O procedimento de lavagem (centrifugação e ressuspensão) foi repetido por um total de três vezes para remover completamente o meio de cultura.

Preparo das Amostras e Métodos de Dessecação

1. A cultura lavada foi distribuída em alíquotas de 300 μL em tubos Eppendorf estéreis.
2. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado, resultando em um *pellet* celular concentrado.
3. Os *pellets* foram então ressuspendidos em um pequeno volume de 30 μL de solução salina 0,9% para criar uma suspensão densa.

4. As amostras foram submetidas aos seguintes tratamentos de dessecação:

- **Liofilização:** Os tubos Eppendorf, abertos e cobertos com parafilm perfurado, foram congelados a -80°C e em seguida colocados em um liofilizador até a completa remoção da água.
- **Sílica Gel:** Os tubos Eppendorf abertos foram colocados dentro de um dessecador contendo sílica gel ativa até a secagem visível das amostras.
- **Dessecação em Teflon:** Alíquotas de 10 μL da suspensão celular densa foram pipetadas sobre quadrados de teflon estéreis dispostos em uma placa de Petri. A placa foi mantida aberta em uma capela de fluxo laminar até a evaporação completa do líquido.
- **Controle (Não Dessecado):** Uma amostra preparada da mesma forma não foi submetida a nenhum método de secagem e foi processada imediatamente para análise de viabilidade.

Análise de Sobrevivência (Ressuspensão e Plaqueamento)

1. **Amostras em Tubos (Liofilizadas e Sílica):** As células dessecadas foram ressuspensas diretamente no tubo pela adição de 270 μL de solução salina 0,9%, atingindo um volume final de 300 μL . A suspensão foi homogeneizada vigorosamente em vórtex.
2. **Amostras em Teflon:** Cada quadrado de teflon com células secas foi transferido para um tubo Eppendorf contendo 300 μL de solução salina e agitado em vórtex para ressuspender as células.
3. **Controle:** Ao *pellet* de controle, foram adicionados 270 μL de solução salina para atingir o volume de 300 μL e servir como referência de 100% de viabilidade.
4. A partir de cada suspensão (volume final de 300 μL , considerada a diluição 10^{-1}), foram realizadas diluições seriadas (1:10) em solução salina 0,9% até a diluição 10^{-5} .
5. Alíquotas de 10 μL de cada diluição foram plaqueadas em triplicata em meio TGY Ágar.
6. As placas foram incubadas a 30°C , e a contagem de UFC foi realizada após 48 horas para determinar a taxa de sobrevivência de cada método.

B.4 Ensaio de Resistência à Radiação UVC

Preparo das Amostras para Dessecação

1. Preparar e lavar as células de *S. bouldardii* conforme o protocolo anterior (item B.2.2).
2. Após a centrifugação final, preparar três suspensões celulares em tubos Eppendorf:
 - **Controle:** *Pellet* ressuspensão em 800 µL de solução salina 0,9%.
 - **Fe³⁺ 5 mM:** *Pellet* ressuspensão em 800 µL de solução de FeCl₃ 5 mM.
 - **Fe³⁺ 10 mM:** *Pellet* ressuspensão em 800 µL de solução de FeCl₃ 10 mM.

Dessecação das Células

1. Em uma placa de Petri, dispor 15 quadrados de teflon estéreis, organizados em 3 grupos de 5.
2. Pipetar 10 µL de cada suspensão celular (Controle, 5 mM e 10 mM) sobre cada um dos 5 quadrados de teflon do grupo correspondente.
3. Deixar a placa de Petri aberta dentro de uma capela de fluxo laminar até a evaporação completa do líquido (dessecação).

Irradiação UVC

1. Posicionar a placa de Petri com as amostras dessecadas sob uma lâmpada UVC (254 nm) a uma distância fixa.
2. Utilizar um irradiômetro para medir o fluxo de radiação na posição da amostra.
3. Retirar um quadrado de teflon de cada grupo antes da irradiação (dose 0 J/m², controle de dessecação).
4. Expor as amostras a doses crescentes de UVC (250, 650, 1500 e 2500 J/m²), retirando um quadrado de teflon de cada grupo após cada dose.

Análise de Sobrevivência

1. Transferir cada quadrado de teflon para um tubo Eppendorf contendo 100 µL de solução salina 0,9%.
2. Agitar em vórtex para ressuspender as células. Esta suspensão representa a diluição 10⁰.
3. Realizar diluições seriadas (1:10) a partir da suspensão inicial.

4. Plaquear e contar as UFC conforme descrito no protocolo B.2.3 para determinar a taxa de sobrevivência em cada dose de radiação.

B.5 Ensaio de Resistência à Dessecação com Ferro (Qualitativo)

1. Preparar e dessecar as amostras de *S. boulardii* (Controle, 0,5 mM, 5 mM e 10 mM de FeCl_3) em quadrados de teflon, conforme protocolo B.3.2.
2. Após a dessecação completa, transferir cada quadrado de teflon para um tubo Falcon de 15 mL contendo 2 mL de meio TGY líquido estéril.
3. Deixar as células reidratarem por 30 minutos em repouso.
4. Agitar vigorosamente em vórtex para garantir a transferência das células do teflon para o meio.
5. Incubar os tubos em agitador a 30°C e 150 rpm.
6. Inspeccionar visualmente os tubos a cada 48 horas, por um período de 6 dias, verificando a presença de turbidez como indicativo de crescimento microbiano.

C Resultados Detalhados, Figuras e Dados Brutos

Este apêndice consolida resultados estatísticos, tabelas com todas as contagens (sem omitir valores; agregadas por condição para caber em página) e as figuras geradas a partir dos dados.

Notas gerais sobre a análise

- **LD (Limite de Detecção):** O limite de detecção foi definido como 100 UFC/mL ($\log_{10} = 2.0$) para os ensaios de resistência a Fe^{3+} em bactérias e para o ensaio de UVC. Para *S. boulardii* no ensaio de Fe^{3+} , o LD foi de 10^5 UFC/mL ($\log_{10} = 5.0$) devido à diluição inicial do tratamento.
- **Censura de Dados:** O símbolo “>” em reduções \log_{10} indica que o valor é um limite inferior, pois não foi detectado crescimento na amostra tratada (contagens abaixo do LD). Para esses casos, a fração de sobrevivência é reportada como um limite superior (regra do 3: se 0 eventos em N tentativas, o limite superior do intervalo de confiança de 95% é $\approx 3/N$).

- **Análise UVC:** O declive da curva de sobrevivência (*slope*) é expresso em unidades de \log_{10} por $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$. Sinais negativos indicam o decaimento da população com o aumento da dose de radiação.

C.1 Ensaio de Resistência a FeCl_3

Resumo por organismo

Tabela 4: Resumo do teste de resistência a 10 mM FeCl_3 por organismo. As reduções são calculadas em escala \log_{10} . Para espécies sem crescimento detectável no tratamento, a redução representa um limite inferior (Controle – LD).

Organismo	n (rep)	Controle (\log_{10})	Tratam. (\log_{10})	Red. (\log_{10})	LD (\log_{10})	Viab. média	$\text{IC}_{95\%}$ (viab.)
<i>E. coli</i>	3	8.68	—	>6.68	2.0	<0.333	—
<i>S. nepalensis</i>	3	8.84	—	>6.84	2.0	<0.333	—
<i>D. radiodurans</i>	3	7.72	—	>5.72	2.0	<0.333	—
<i>S. boulardii</i>	3	8.42	6.91	1.51	5.0	0.0312	[0.0288, 0.0336]

Comentário Nas três espécies bacterianas, não foi detectado crescimento após exposição a 10 mM de FeCl_3 . A redução na viabilidade é, portanto, superior a 5-6 ordens de magnitude. Em contraste, *S. boulardii* demonstrou resistência parcial, com uma viabilidade média de 3.12% ($\text{IC}_{95\%}$: 2.88–3.36%) sob as mesmas condições.

Dados brutos de contagem

As tabelas a seguir apresentam as contagens de UFC de todas as replicatas experimentais.

Tabela 5: *E. coli* — Resistência a Fe^{3+} (10 mM): contagens e métricas.

Condição	Diluição	Replicatas (UFC)	Média UFC
Controle	10^{-5}	29, 29, 21, 60, 59, 59, 58, 60, 56	47.9
Fe^{3+}	10^0	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.0

Tabela 6: *S. nepalensis* — Resistência a Fe^{3+} (10 mM): contagens e métricas.

Condição	Diluição	Replicatas (UFC)	Média UFC
Controle	10^{-5}	67, 68, 58, 39, 54, 47, 91, 94, 101	68.8
Fe^{3+}	10^0	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.0

Tabela 7: *D. radiodurans* — Resistência a Fe^{3+} (10 mM): contagens e métricas.

Condição	Diluição	Replicatas (UFC)	Média UFC
Controle	10^{-4}	61, 54, 52, 52, 50, 57, 48, 50, 48	52.4
Fe^{3+}	10^0	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.0

Tabela 8: *S. boulardii* — Resistência a Fe^{3+} (10 mM): contagens e métricas.

	Diluição	Replicatas (UFC)	Média UFC
Controle (C+)	10^{-5}	30, 28, 36, 20, 23, 21, 22, 28, 27	26.1
Fe^{3+}	10^{-3}	103, 102, 89, 70, 74, 71, 74, 73, 75	81.2

Figuras do Ensaio de Resistência a Fe^{3+}

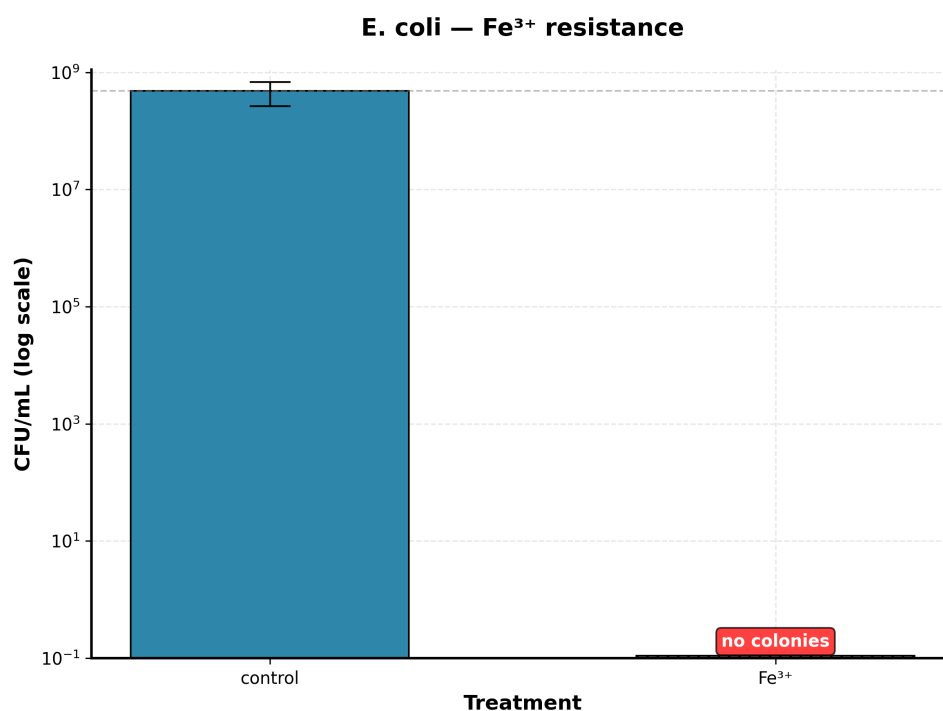


Figura 2: Comparação da viabilidade de *E. coli* (Controle vs. Fe^{3+}). A linha tracejada indica o limite de detecção (LD).

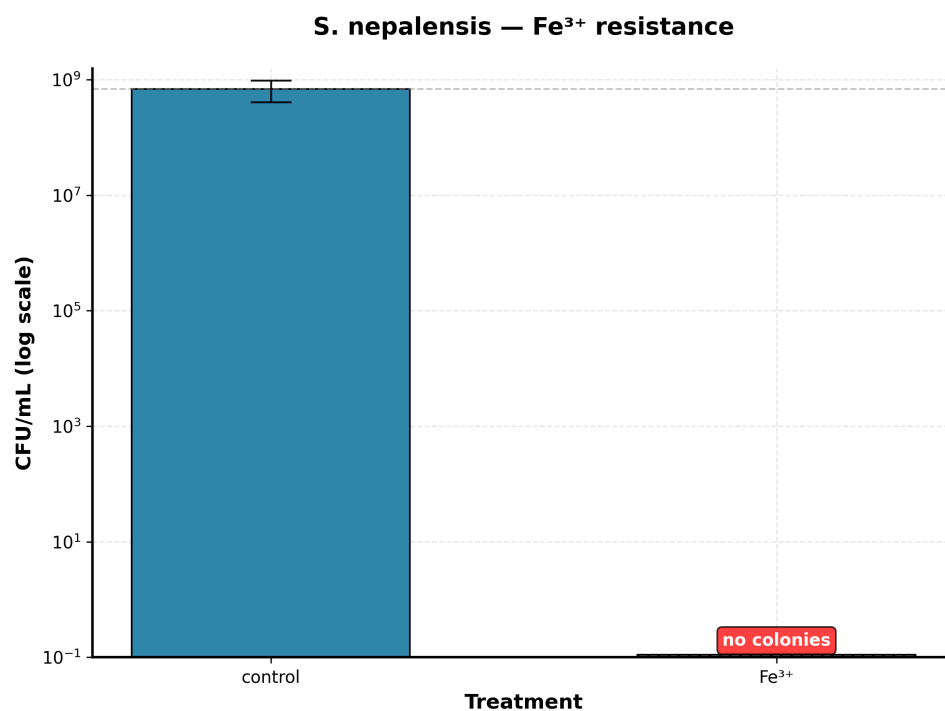


Figura 3: Comparação da viabilidade de *S. nepalensis* (Controle vs. Fe³⁺).

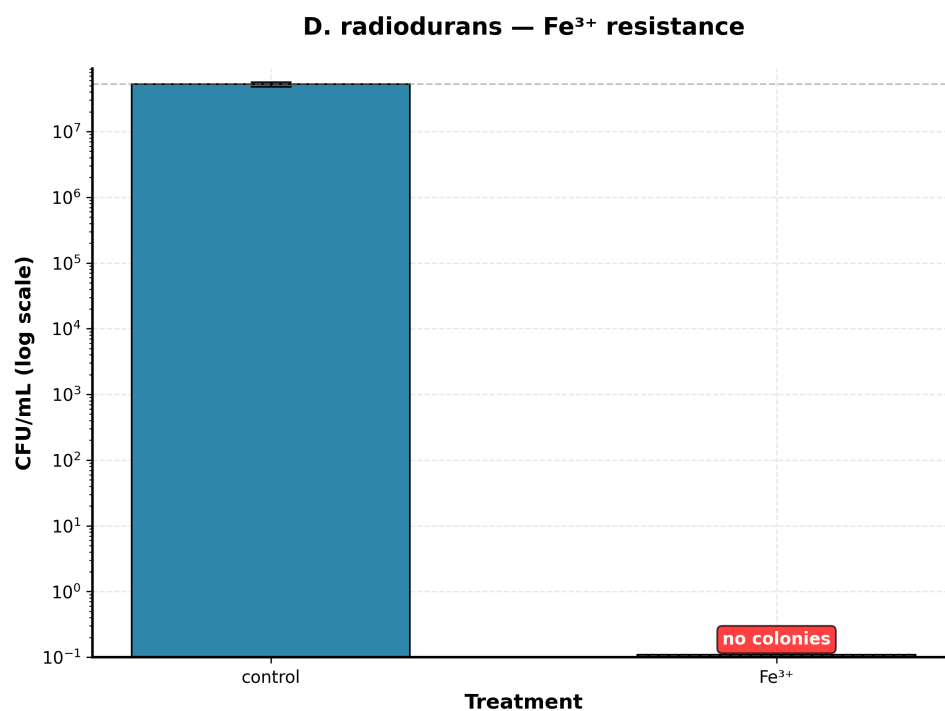


Figura 4: Comparação da viabilidade de *D. radiodurans* (Controle vs. Fe³⁺).

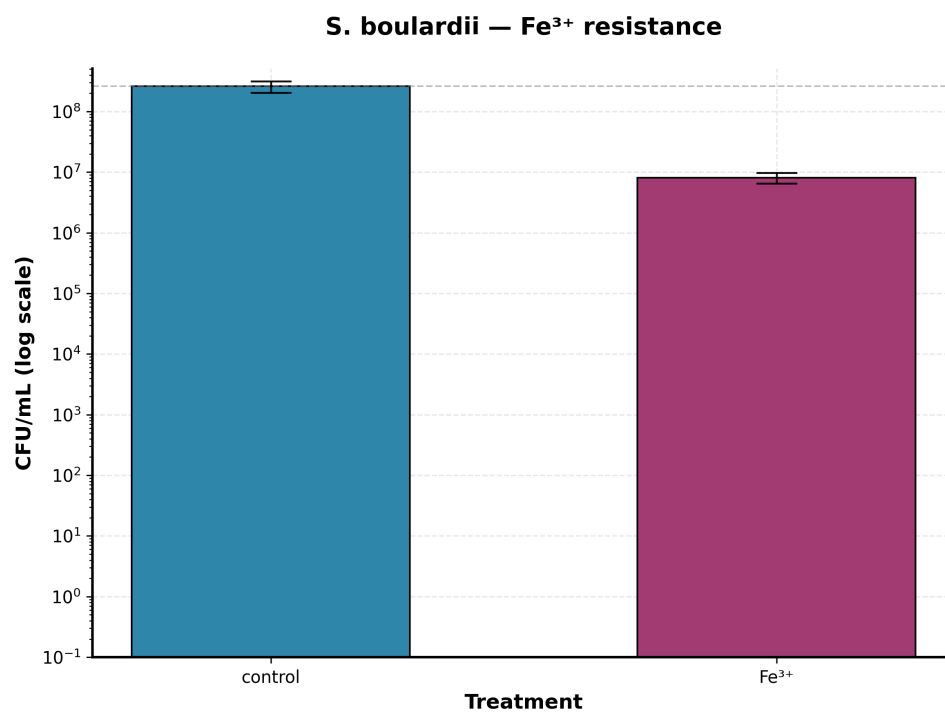


Figura 5: Comparação da viabilidade de *S. boulardii* (Controle vs. Fe³⁺).

C.2 Ensaio de resistência à Dessecação

Tabela 9: Comparativo de métodos de dessecação para *S. bouldardii*. A sobrevivência relativa (S_{rel}) foi aproximada ajustando pela diferença de uma ordem de magnitude na diluição plaqueada (controle 10^{-5} vs. tratamentos 10^{-4}).

Método	Diluição	Replicatas (UFC)	Média UFC	S_{rel} (aprox.)
Controle (não dessecado)	10^{-5}	25, 29, 26	26.7	1.00
Liofilização	10^{-4}	20, 23, 21	21.3	0.08
Sílica Gel	10^{-4}	56, 52, 56	54.7	0.21
Fluxo Laminar + Teflon	10^{-4}	51, 50, 44	48.3	0.18

Comentário: As três abordagens de dessecação resultaram em sobrevivência da mesma ordem de magnitude. O método de "fluxo laminar + Teflon" foi selecionado para os experimentos subsequentes devido a vantagens operacionais, como menor risco de contaminação cruzada e compatibilidade com o protocolo de irradiação.

C.3 Ensaio de resistência à Radiação UVC

Contagens brutas de UFC (agregadas por dose)

Tabela 10: Contagens de UFC para *S. bouldardii* dessecada e exposta a diferentes doses de radiação UVC.

Dose (J/m^2)	Diluição	Replicatas (UFC)	Média UFC
0	10^{-4}	48, 41, 51, 63, 67, 64, 44, 43, 46	52.0
250	10^{-2}	60, 58, 56, 18, 15, 15, 60, 63, 55	44.4
650	10^{-2}	22, 21, 19, 15, 19, 17, 26, 22, 20	20.1
1500	10^{-1}	55, 60, 56, 54, 42, 58, 50, 49, 53	53.0
2500	10^0	34, 29, 31, 30, 31, 33, 27, 30, 35	31.1

Métricas derivadas por dose de irradiação

Tabela 11: Métricas de sobrevivência por dose, com médias e intervalos de confiança ($IC_{95\%}$) calculados por bootstrap. S é a fração de sobrevivência (CFU/CFU_0).

Dose ($J \cdot m^{-2}$)	CFU/mL (média)	S (média)	$IC_{95\%}(S)$	$\log_{10} S$ (média)	Red. \log_{10} [IC]
0	5.19e+07	1.0000	[1.00, 1.00]	0.00	0.00 [0.00, 0.00]
250	4.44e+05	0.0095	[0.0061, 0.0128]	-2.13	2.13 [1.90, 2.36]
650	2.01e+05	0.0041	[0.0033, 0.0049]	-2.41	2.41 [2.32, 2.50]
1500	5.30e+04	0.0011	[0.0009, 0.0012]	-2.99	2.99 [2.92, 3.06]
2500	3.11e+03	6.17e-05	[5.50e-05, 6.87e-05]	-4.22	4.22 [4.17, 4.27]

Ajuste de modelos, parâmetros e diagnósticos

Tabela 12: Parâmetros do modelo log-linear e medidas derivadas para *S. boulardii*.

Organismo	Slope $_{\log 10}$ (SE)	D_{10} [IC]	LD_{50} [IC]	D_{90}	D_{99}	R^2_{adj}
<i>S. boulardii</i>	-0.0019 (0.0001)	525 [515, 534]	158 [155, 161]	525	1050	0.514

Tabela 13: Comparação de modelos por AIC e diagnósticos de GLM.

	AIC (log-linear)	AIC (power)	AIC (bifásico)	GLM AIC (Poisson/NB)	Modelo Preferido
<i>S. boulardii</i>	-2.07	-63.84	-131.96	2811.7 / 474.4	Bifásico (NB)

Parâmetros do modelo bifásico (preferido): $f = 0.984$, $k_1 = 0.560$, $k_2 = 0.002$. Isso sugere uma população composta por uma fração majoritária (98.4%) sensível à UV e uma subpopulação minoritária (1.6%) mais resistente, formando a "cauda" da curva de sobrevivência.

Figuras do Ensaio de Irradiação UVC

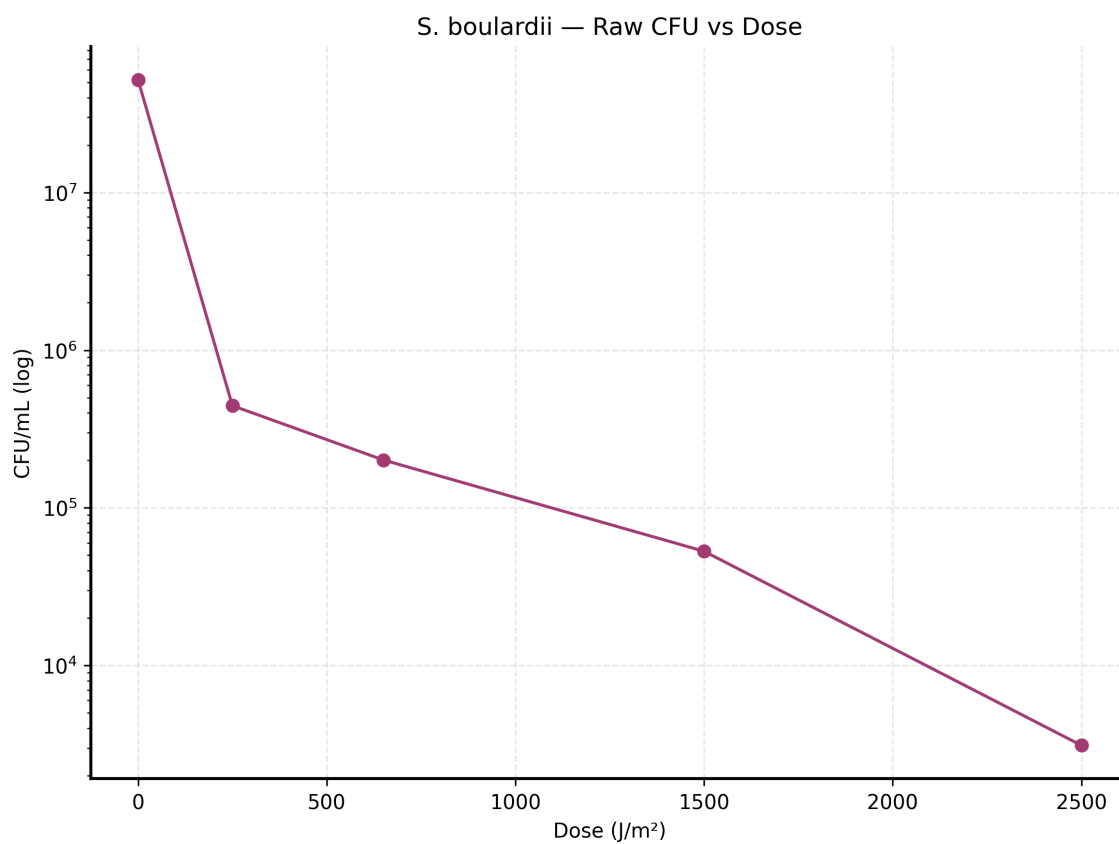


Figura 6: Curva de sobrevivência de *S. boulardii* à radiação UVC (contagem UFC).

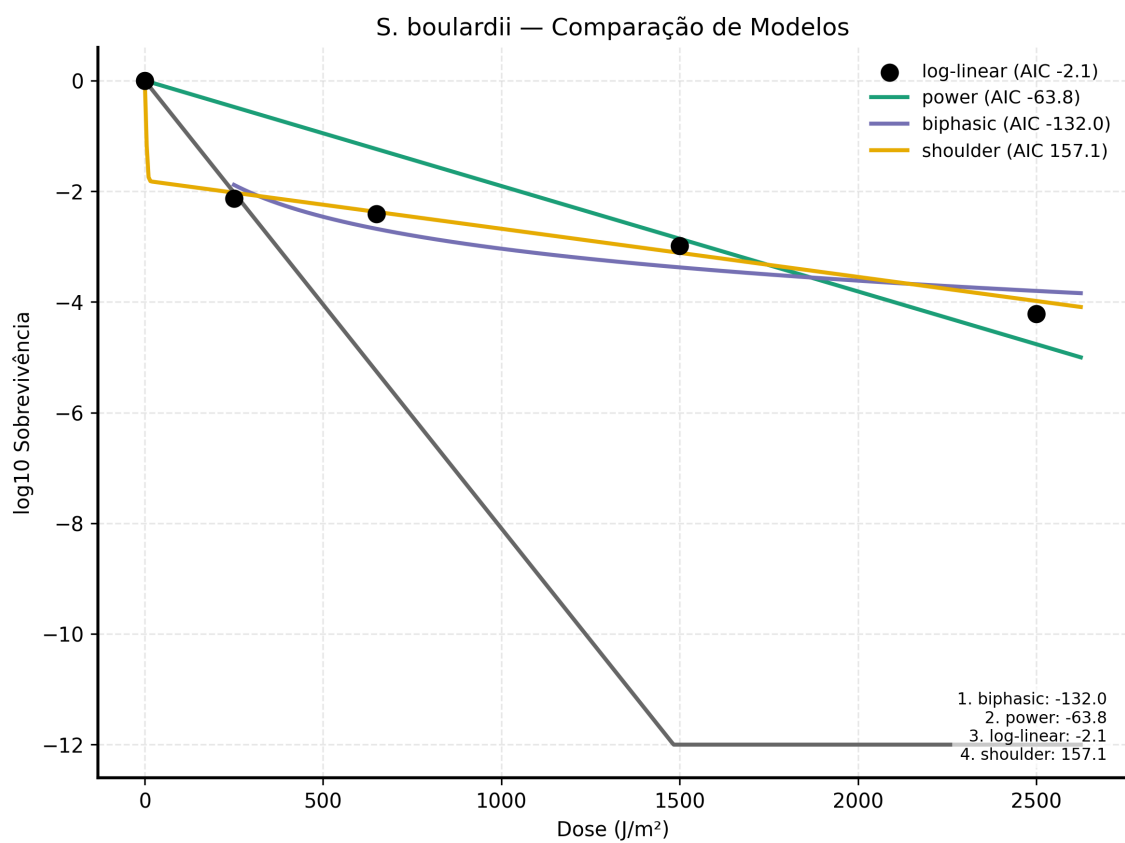


Figura 7: Comparação de diferentes modelos de sobrevivência ajustados aos dados de UVC para *S. bouldardii*, avaliados pelo critério de informação de Akaike (AIC).