

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

JOSE MIGUEL DIAZ ROMERO

**Efeito da especiação química sobre a
absorção de ferro em Symbiodiniaceae.**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Deposito na SPG

13/12/2020

JOSE MIGUEL DIAZ ROMERO

**Efeito da especiação química sobre a
absorção de ferro em Symbiodiniaceae**

*Dissertação apresentada ao Instituto
de Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Programa Química)*

Orientador: Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R542e Romero, Jose Miguel Diaz
Efeito da especiação química sobre a absorção de ferro em Symbiodiniaceae / Jose Miguel Diaz Romero.
- São Paulo, 2020.
85 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Pannia Espósito, Breno

1. Complexos de ferro(III). 2. Especiação de ferro. 3. Symbiodiniaceae. 4. Estresse térmico. I. T. II. Pannia Espósito, Breno, orientador.

***A meus familiares e amigos pelo apoio e
confiança***

AGRADECIMENTOS

Foi para mim uma oportunidade única e especial integrar o grupo de pesquisa Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos - LAQBAM. Estando em Lima - Peru há um pouco mais de dois anos, decidi iniciar esta travessia sem pressagiar que me deparavam muitos desafios e aprendizagens novos no dia a dia, não só academicamente, mas também a nível pessoal e espiritual.

Quero expressar meu apreço ao Prof. Dr. Breno Pannia Espósito que me orientou durante todo o desenvolvimento da pesquisa passando por mudanças de ideias para consolidar o trabalho com comentários e revisões detalhadas que foram sumamente úteis. Obrigado por oferecer apoios, por contribuir ao meu crescimento profissional e fazer da pesquisa científica uma linguagem articulada.

Minha família, meu pai e mãe (*in memoriam*), especialmente meu irmão Alejandro e irmã Janeth merecem uma menção especial neste trabalho. Apesar da grande distância entre nós, o apoio emocional, paciência e compreensão oferecido por eles foi sumamente importante para mim.

À Dra. Flavia Saldanha Corrêa, pela paciência que teve comigo, por ter sempre as portas abertas do laboratório, pela assistência nos cultivos das algas. Sou muito grato. A Marina Tonetti Botana pela assistência técnica e sugestões oferecidas para o desenvolvimento de experimentos com zooxantelas.

À Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura e sua equipe pelo apoio nas análises de amostras.

Aos atuais e ex-integrantes do LAQBAM que conheci durante minha estada, pela grande amizade e por me incentivarem a entender os fenômenos aportando ideias. Além do conforto em momentos de muita confusão, tantos conselhos, ideias, foi um privilégio para mim conhecer pessoas tão especiais.

À equipe de funcionários de pós graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio econômico concedido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio aos projetos e infraestrutura oferecida.

En “La casa de cartón” dice: Límpiame los ojos de entusiasmos”. Y, claro, en esa época no me los había limpiado, estaba entusiasmado

Marco Aurelio Denegri

“Iron, classically known as the Metal of Mars, has been universally perceived as the symbol of human strength, obstinacy, fortitude, honor, courage, sharpness (of body and mind), tenacity, and confidence in power”

In Search for Symbolic Qualities of Iron: The Metal of Life

Zvi Ioav Cabantchik

“En la vida nada es fácil. Si algo en tu vida te parece que fue fácil, es porque no te esforzaste lo suficiente para hacerlo mejor”

Barton Zwiebach

RESUMO

Diaz Romero, J. M. Efeito da especiação química sobre a absorção de ferro em Symbiodiniaceae. 2020 (85 p). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Corais que formam simbiose com dinoflagelados fotossintéticos da família Symbiodiniaceae são suscetíveis aos eventos de branqueamento devido a aumentos de temperatura, com efeitos negativos na vida dos recifes coralíneos. O ferro, como micronutriente, é essencial para o desenvolvimento dos microrganismos marinhos, embora esteja disponível em concentrações extremamente baixas encontra-se naturalmente complexado por diversos carregadores. Nesta situação em que a especiação do ferro está dominada por ligantes, as microalgas possuem mecanismos de assimilação e mobilização de ferro a partir de seus complexos. Assim, primeiro comparamos diferentes fontes de ferro a partir de diversos complexos bem conhecidos em propriedades químicas para determinar o crescimento, absorção de ferro em cinco espécies, e toxicidade para uma espécie, da família Symbiodiniaceae. Segundo, avaliamos o efeito das diversas fontes de ferro em *Breviolum minutum*, sobre o crescimento frente ao choque térmico, e sua possível relação com a resiliência dos corais após de eventos de branqueamento.

No primeiro experimento a exposição ao Fe(II) em geral produziu respostas marcadamente positivas, com altas taxas de crescimento e acumulação de ferro intracelular. Semelhantes resultados foram alcançados para exposição ao complexo lipofílico Fe(DFX)₂ para quatro das espécies em estudo. Por outro lado, foi possível notar que para a espécie *Symbiodinium microadriaticum* o crescimento é independente da fonte ferro. Na espécie termossensível *Breviolum minutum* o choque térmico é adverso, embora a suplementação de ferro após o choque térmico resulte em taxas de crescimento e populações mais altas independentemente da fonte de ferro. Resultados semelhantes foram para os complexos Fe(DFX)₂, FeDFO e FeEDTA suplementado antes do estresse térmico.

Finalmente, a exposição ao complexo Fe(8-HQ) mostrou ser altamente deletéria para as microalgas, o que nos levou a determinar sua toxicidade em *Durusdinium glynini*. Estabeleceu-se uma concentração inibitória média de $9,5 \pm 0,47 \mu\text{mol L}^{-1}$. Esse composto pode ter potencial como agente algicida.

Palavras-chave: ferro, especiação, Symbiodiniaceae, estresse térmico.

ABSTRACT

Diaz Romero, J. M. Effect of the chemical speciation on the absorption of iron in Symbiodiniaceae. 2020. (85 p.). Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Corals form symbiosis with photosynthetic dinoflagellates of the family Symbiodiniaceae which are susceptible to bleaching events due to increases in temperature, with negative effects on the life of coral reefs. Iron, as a micronutrient, is essential for the development of marine microorganisms, although it is found in extremely low concentrations, naturally complexed by several carriers. In this situation in which iron speciation is dominated by ligands, microalgae have mechanisms of assimilation and mobilization of iron from its complexes. Thus, we first compared different sources of iron from several well-known complexes to determine growth, absorption in five species, and toxicity to one species of the Symbiodiniaceae family. Secondly, we evaluated the effect of the various sources of iron in *Breviolum minutum*, on the growth against the thermal shock, and its possible relation with the resilience of the corals after bleaching events.

In the first experiment, exposure to Fe (II) in general produced markedly positive responses, with high rates of growth and accumulation of intracellular iron. Similar results were achieved for exposure to the lipophilic complex Fe(DFX)₂ for four of the species under study. On the other hand, it was possible to notice for *Symbiodinium microadriaticum* the growth is independent of the iron source. In the thermally sensitive species *Breviolum minutum*, thermal shock is adverse, although iron supplementation after thermal shock results in higher growth rates and populations regardless of the iron source. Similar results were for Fe(DFX)₂, FeDFO, and FeEDTA complexes supplemented before thermal stress.

Finally, exposure to the Fe(8-HQ) complex proved to be highly harmful to microalgae, which led us to determine its toxicity in *Durusdinium glynni*. An average inhibitory concentration of $9.5 \pm 0.47 \mu\text{mol L}^{-1}$ was established. This result can have a potential algaecide activity.

Keywords: Iron, speciation Symbiodiniaceae, thermal stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos funcionais individuais de sideróforos e os complexos que formam com ferro(III). Os sideróforos se coordenam com o íon férrico mediante átomos doadores duros como oxigênio com alta densidade negativa ou neutro.

Figura 2. Diagrama simplificado que mostra diversos processos para transportar as duas formas químicas de ferro, Fe(II) e Fe(III), ao interior das algas eucarióticas a partir de diversas espécies químicas. Devido ao forte ambiente oxidante pela presença de oxigênio a maior parte do ferro se acha de forma insolúvel (i. e. oxohidróxidos e coloides). O ferro biodisponível pode encontrar-se como Fe(III) unido com ligantes orgânicos (L). O íon ferroso (Fe(II)), é fornecido principalmente mediante deposição úmida ou foto redução do íon Fe(III). Em geral, o ferro unido a ligantes deve reduzir-se antes de ser absorvido pela célula. O íon ferroso (Fe(II)), é fornecido principalmente mediante deposição úmida ou foto redução do íon Fe(III) nas zonas mais superficiais do oceano. Em geral, o ferro unido a ligantes deve reduzir-se na membrana antes de ser absorvido pela célula. O íon ferroso pode-se assimilar mediante transportadores bivalentes não específicos, em outros casos também pode se reoxidar e transportar através de um sistema de captação de Fe(III), usando ferroxidases.

FRE: Ferrireductase; Complexo transportador de ferro de alta afinidade: 1) MCO: ferroxidase (multicobre) 2) FTR: Permeasse férrica; ZIP / NRAMP: Sistemas de transporte para ferro bivalente, $h\nu$ = energia para provocar a foto redução.

Figura 3. **A** Pólipo de *Aiptasia pallida* mostrando a coloração marrom característica, conferida pelos pigmentos fotossintéticos da zooxantela. **B** Tentáculos do pólipo contendo centenas de células individuais da família Symbiodiniaceae dentro do tecido gastrodérmico (o tecido epidérmico não contém simbiontes e é visível como a fina camada transparente na periferia do tentáculo) **C** A falta de autofluorescência da clorofila no extremo do tentáculo confirma a distribuição gastrodérmica das zooxantelas. **D** Representação da assimilação de ferro em zooxantelas simbióticas (provavelmente o ferro depende do fornecimento do hospede). Dentro da célula do hospede o ferro circula ligado à transferrina e pode ser armazenado maiormente na ferritina, para reduzir a possibilidade de iniciar reações que desencadernam a produção espontânea de EROs via reação de Fenton, e reservas de ferro lábil. A mobilização de ferro a traves do simbiossomo dá-se mediante endocitoses do complexo ferritina-ferro (Song, Wu, Hong & Chen, 2015)

Figura 4 Efeito visual de um coral antes e depois do branqueamento. Esquerda: Aparência branca de coral pela perda das zooxantelas aparência branca como resposta ao estresse submetido. A descoloração do coral, tem como consequências a perda de grandes extensões de habitats marinhos. Direita: Um coral com aparência saudável e colorida com zooxantelas. (<https://www.publico.pt/2017/08/27/infografia/corais-em-stress-234>)

Figura 5. Estrutura química dos complexos de ferro(III) e aparência física dos complexos de ferro sintetizados *in situ*.

Figura 6 A. Esquema da sínteses *in situ* dos complexos de ferro(III). **B.** Montagem da placa para determinar a estequiometria dos complexos mediante o método da relação molar.

Figura 7 A. Esquema da semeadura das diferentes espécies da família Symbiodiniaceae no meio de cultura livre de ferro. **B.** Condições de trabalho do laboratório para o cultivo de das espécies no meio livre de ferro.

Figura 8 A. Montagem experimental para o estudo do “Efeito do choque térmico em *Breviolum minutum*” exposto aos complexos de ferro(III). **A)** Condições de cultivo para as espécies da família Symbiodiniaceae no meio F/2 – Guillard sem suplementação de ferro **B** Modo de cultivo dos tubos contendo os cultivos de *Breviolum minutum* submergidos em água prévio à choque térmico **C** Montagem do experimento para avaliar o efeito do choque térmico em *Breviolum minutum*. Se utilizaram termóstatos com aquecedor para elevar a temperatura e para evitar que a temperatura se focalize em pontos próximos aos termostatos se empregou bombas de circulação para homogeneizar a temperatura dentro das badejas.

Figura 9 Esquema do montagem da placa para determinar toxicidade do complexo Fe(8-HQ) com concentrações de 50 a 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em *Durusdinium glynni*.

Figura 10 A Espectros de absorção UV-Vis de 8-HQ (8 mmol L^{-1}), cloreto férrico (0,4 mmol.L^{-1}), Fe(8-HQ) (5 mmol L^{-1}) em DMSO. **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com 8-HQ.

Figura 11 A Espectros de absorção UV-Vis do HBED (0,5 mmol L^{-1}), cloreto férrico (0,4 mmol L^{-1}), FeHBED (0,5 mmol L^{-1}) em DMSO. **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com HBED

Figura 12 A Espectros de absorção UV-Vis do deferiprona (0,5 mmol L^{-1}), Fe(DFP)_3 (0,1 mmol L^{-1}) em DMSO **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com DFP.

Figura 13 A Espectros de absorção UV-Vis, deferasirox (0,32 mmol L^{-1}), cloreto férrico (0,5 mmol L^{-1}) Fe(DFX)_2 (0,2 mmol L^{-1}) em DMSO **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com DFX.

Figura 14 A Espectros de absorção UV-Vis, deferoxamina (2,5 mmol L^{-1}), cloreto férrico (2,5 mmol L^{-1}) e FeDFO (2,5 mmol L^{-1}) em água (pH = 5,5) **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com DFO (1:1)

Figura 15 A Espectros de absorção UV-Vis do EDTA (5,0 mmol L^{-1}), cloreto férrico (2,5 mmol L^{-1}) e FeEDTA (1,0 mmol L^{-1}) em água (pH = 5,5) **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com EDTA.

Figura 16 A Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) em *Symbiodinium microadriaticum* em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard - F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Ao redor dos cinco primeiros dias a microalga inicia o período de aclimação. **B** Taxas de crescimento (μ) do *Symbiodinium microadriaticum* exposto aos complexos de ferro(III) determinados na fase exponencial de crescimento. Os valores representam a média \pm SD (n = 3) para um nível de significância de ***p < 0,001, ** < 0,01, * < 0,05. As barras com letras iguais não são significativamente diferentes p > 0,05

Figura 17 A Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) no *Breviolum minutum*, em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard-

F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Ao redor dos cinco primeiros dias a microalga inicia o período de aclimação. **B** Taxas de crescimento (μ) do *Breviolum minutum* exposto aos complexos de ferro(III) determinadas na fase exponencial de crescimento. Os valores representam a média \pm SD (n = 3) com diferenças estatísticas (**** p < 0,0001, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05). As barras com letras iguais não são significativamente diferentes (p > 0,05), ND = não detectado.

Figura 18 A Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) no *Cladocopium goreau*, em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard-F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Ao redor dos cinco primeiros dias a microalga inicia o período de aclimação lenta. **B** Taxas de crescimento (μ) do *Cladocopium goreau* exposto aos complexos de ferro(III). Os valores representam a média \pm SD (n = 3), como diferenças estatísticas (**p < 0,01, ****p < ,0001) As barras com letras iguais não são significativamente diferentes (p >0,05)

Figura 19 A Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) no *Effrenium voratum*, em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard-F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$). **B** Taxas de crescimento (μ) do *Effrenium voratum* exposto aos complexos de ferro(III) determinadas na fase exponencial de crescimento. Os valores representam a média \pm SD (n = 3) com diferenças estatísticas (***p < ,001; ****p < ,0001). As barras com letras iguais não são significativamente diferentes (p >0,05)

Figura 20 A Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) no *Fugacium kawagutii*, em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard-F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Durante os cinco primeiros dias a microalga inicia o período de aclimação lenta. **B** Taxas de crescimento (μ) do *Fugacium kawagutii* exposto aos complexos de ferro(III) determinadas na fase exponencial de crescimento. Os valores representam a média \pm SD (n = 3) com diferenças estatísticas de (****p < 0,0001; * < 0,05) As barras com letras iguais não são significativamente diferentes (p > 0,05) ND = não detectado.

Figura 21 A Variação na população das espécies da família Symbiodiniaceae pela exposição aos quelantes livres. **B** Velocidade de crescimento para as diferentes microalgas cultivadas expostas aos quelantes (n = 1) ND = não detectado.

Figura 22 A Teor de ferro intracelular total para diferentes espécies da família Symbiodiniaceae expostos aos complexos de ferro(III) em meio Guillard – F/2 livre de ferro de ferro. A amostragem foi após 21 dias de aplicação dos complexos. Todos os tratamentos foram suplementados com 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe. As barras de erro representam o desvio padrão para cultivos em triplicata com diferenças estatísticas: * p \leq 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. As barras com letras iguais não são significativamente diferentes p > 0,05. **B** Teor de ferro intracelular total para diferentes espécies da família Symbiodiniaceae expostos aos quelantes em meio Guillard – F/2 livre de ferro. A amostragem foi feita após 21 dias da aplicação dos quelantes na mesma concentração dos complexos (n = 1).

Figura 23 Impacto do choque térmico ($33,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$ por 4 horas) no crescimento após 1 e 7 dias em *Breviolum minutum* cultivado em meio Guillard-F/2 isento de ferro com a adição de complexos de ferro(III). Os complexos de ferro foram adicionados **ANTES**

do choque térmico. **A** Densidade celular nas culturas submetidas ao choque térmico; **B** Densidade celular nas culturas controle (desenvolvendo-se a $20,5 \pm 0,5$ °C); **C** Comparação das taxas máximas de crescimento (μ) nas culturas controle e estressadas pelo calor. Os dados representam os valores médios \pm DP das triplicatas. ND = Não detectado. Com diferenças estatísticas: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. As barras com letras iguais não são significativamente diferentes $p > 0,05$, ns = não significativo

Figura 24 Impacto do choque térmico ($34,8 \pm 0,4$ ° C por 4 horas) no crescimento após 1 e 7 dias em *Breviolum minutum* em meio Guillard-F / 2 isento de ferro com a adição de ferro(III) Os complexos de ferro foram adicionados **APÓS** o choque térmico. **A** Densidade celular nas culturas submetidas ao choque térmico; **B** Densidade celular nas culturas controle (desenvolvendo-se a $22 \pm 0,7$ ° C); **C** Comparação das taxas máximas de crescimento (μ) nas culturas controle e estressadas pelo calor. Os dados representam os valores médios \pm DP das triplicatas. Com diferenças estatísticas: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. As barras com letras iguais não são significativamente diferentes $p > 0,05$.

Figura 25. Exposição de *Durusdinium glynni* ao complexo Fe(8-HQ) **A.** Variação na população frente a diferentes concentrações do complexo Fe(8-HQ), as concentrações foram determinadas para 1, 24, 36 e 48 horas. **B** Curva doses-resposta Após 24 horas de exposição a diferentes concentrações (50, 30, 20, 10, 5 e $1 \mu\text{mol L}^{-1}$) do complexo Fe(8-HQ). Os são apresentados como média \pm DP (n = 3)

Esquema 1. Estruturas químicas de quelantes com alta afinidade pelo ferro. Os átomos em vermelho são os sítios de coordenação com ferro. **A.** (DFP) (3-hidroxi-1,2-dimetilpiridin-4-ona) **B** (DFX - EXJADE) (ácido N,N'-di(2-hidroxibenzil)etilenodiamina-N,N'-di(acético)) **C** ácido N,N'-di(2-hidroxibenzil)etilenodiamina-N,N'-di(acético) **D.** (DFO) ácido N-[5-[[4-[5-[acetyl(hidroxi)amino]pentilamino]-4-oxobutanoil]-hidroxiamino]pentil]-N'-(5-aminopentil)-N'-hidroxibutanediamida **E** (8-HQ - Oxina) (quinolin-8-ol) **F** (EDTA) ácido 2-[2-[bis(carboximetil)amino]etil-(carboximetil)amino]acético.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DFO: Deferoxamina

DFX: Deferasirox

DFP: Deferiprona

DTPA: Ácido dietilentriaminopentaacético

8-HQ: 8-hidroxiquinolina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EROs: Espécies reativas de oxigênio

EDTA: Ácido etilenodiamino tetraacético

Fe(II): Íon ferroso ou “Ferro livre”

GF AAS: Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (pelas siglas em inglês: Graphite furnace atomic absorption spectroscopy)

HBED: Ácido N,N'-di(2-hidroxibenzil)etilenodiamina-N,N'-di(acético)

HBS: Solução HEPES Salina tamponada

IC50: Concentração inibitória do 50% da população de células

K_{sp} = constante do produto de solubilidade (25 °C, 1 atm)

LogP_{o/w}: Logaritmo do coeficiente de partição

Logβ_{Fe(III)}: Constante de estabilidade do complexo de ferro

p[Fe] = logaritmo negativo da concentração de ferro para uma temperatura dada

PSI/PSII = Foto sistema I e II respectivamente

rcf = Relative centrifugal force - força centrífuga relativa (FCR).

Sid = Sideróforo

Sid-Fe = Complexo formado entre sideróforo e ferro

TCLM: Transferência de carga ligante - metal

UV/Vis: Espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Por que o ferro é importante nos ambientes marinhos?	17
1.2 Transporte de ferro em microrganismos marinhos	19
1.3 Quelantes de ferro em medicina	21
1.3.1 Quelantes hexadentados de ferro(III)	22
1.3.1.1 Deferoxamina B	22
1.3.1.2 HBED	22
1.3.2 Quelantes tridentados de ferro(III)	22
1.3.2.1 Deferasirox	22
1.3.3 Quelantes bidentados de ferro(III)	23
1.3.3.1 Deferiprona.....	23
1.3.3.2 8-Hidroxiquinolina	23
1.4 Symbiodiniaceae, Corais e ferro	24
1.5 Estresse oxidativo e branqueamento coralíneo	27
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Organismos	30
3.2 Preparação dos complexos de ferro(III).....	31
3.3 Caracterização dos complexos de ferro mediante análises por espectroscopia UV/VIS	32
3.4 Pré-cultivo das espécies da família Symbiodiniaceae no meio Guillard F/2 isento de ferro	33
3.5 Monitoramento da variação da população e determinação da velocidade de crescimento das espécies da família Symbiodiniaceae frente aos complexos do ferro(III)	34
3.6 Determinação do ferro intracelular nas espécies da família Symbiodiniaceae por absorção atômica.....	35

3.7 Efeito do choque térmico na variação da população do <i>Breviolum minutum</i> exposto aos complexos de ferro(III)	36
3.8 Teste de toxicidade do complexo Fe(8-HQ) para espécie <i>Durusdinium glynni</i> .	38
3.9 Determinação do coeficiente de partição de complexos de ferro(III)	39
3.10 Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Espectroscopia eletrônica UV/Vis dos complexos de ferro.....	41
4.2 Determinação do coeficiente de partição ($\log P_{o/w}$) em complexos de ferro(III) .	49
4.3 Monitoramento da variação da população e determinação da velocidade de crescimento das espécies da família Symbiodiniaceae frente aos complexos do ferro(III)	50
4.4 Determinação do ferro intracelular nas espécies da família Symbiodiniaceae por absorção atômica.....	62
4.5 Efeito do choque térmico na variação da população do <i>Breviolum minutum</i> exposto aos complexos do ferro(III)	65
4.6 Teste de toxicidade do complexo Fe(8-HQ) para espécie <i>Durusdinium glynni</i> ..	70
5. CONCLUSÕES.....	72
6. REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

O ferro recebeu muita atenção por sua importância e limitação como micronutriente em regiões do oceano com alto conteúdo de nutrientes e ótimas condições para o crescimento do fitoplâncton (Martin, 1990; Martin & Fitzwater, 1988). Embora seja um dos elementos mais abundantes da Terra, sua concentração é muito baixa no oceano, porém experimentos baseados em enriquecimento de ferro deram importante evidência de que é um recurso elementar que controla a produtividade primária (Schoffman, Lis, Shaked & Keren, 2016). A demonstração mais importante desta teoria foram os experimentos de fertilização com ferro nos oceanos, cujos resultados demonstraram a estimulação da fotossíntese, forte diminuição da pressão do dióxido de carbono superficial dos oceanos e, em algumas ocasiões, aumento na biomassa do fitoplâncton suficiente para ser visto desde o espaço, incluindo florações de algas nocivas (e.g. produtoras de substâncias deletérias). No entanto esses efeitos foram variáveis dependendo do ambiente marinho, além de não se terem considerado as repercussões sobre a vida oceânica (Aumont & Bopp, 2006; Yoon *et al.*, 2018).

Do ponto de vista químico, a administração de sais de ferro ao mar, conduz ao metal traço a permanecer em contato com o fitoplâncton durante pouco tempo (Santana-Casiano, González Dávila & Millero, 2005), devido a que a esfera de coordenação está saturada com moléculas de água e exposta ao pH marinho ocasionando a precipitação para o fundo oceânico formando o detrito marinho. Adicionalmente, nas zonas muito profundas o pH marinho é mais ácido, produzido pela decomposição da matéria orgânica que sedimenta das águas superficiais, e reações de remineralização que geram CO₂ acidificando mais as águas, afetando por exemplo organismos que possuem estruturas calcárias. Abordando esta questão desde outra perspectiva, uma boa alternativa para superar este inconveniente é o uso de moléculas bem estudadas com alta afinidade por ferro que estabilizem o ferro mediante interações metal-ligante para evitar ou retardar a precipitação, coagulação e sedimentação na água de mar (Chen, Wang & Guo, 2004).

1.1 Por que o ferro é importante nos ambientes marinhos?

A importância e influência dos metais-traço (Fe, Zn, Mn, Ni, Cu, Co, Cd, Mo) sobre o crescimento e desenvolvimento natural das comunidades do fitoplâncton marinho está amplamente documentada (Sunda, 2012; Twining & Baines, 2013). Destes metais, é sabido que o ferro tem um efeito importante nos ciclos de regulação biológica de carbono e nitrogênio, fotossíntese e crescimento sobre diversas espécies de microrganismos marinhos (Berman-Frank, Cullen, Shaked, Sherrell & Falkowski, 2001).

Em efeito o ferro, o quarto elemento metálico mais abundante na crosta terrestre, é um metal-traço essencial requerido em mínimas quantidades pelos microrganismos aquáticos (Kudo *et al.*, 2006; Sunda, Swift & Huntsman, 1991; Twining & Baines, 2013). O ferro é importante para os microrganismos marinhos pois participa em processos metabólicos interligados como a síntese de ADN, fotossíntese e respiração. Por outro lado, devido à sua química redox flexível, o ferro ativa diversas vias metabólicas atuando como grupo prostético de muitas enzimas como por exemplo a citocromo oxidase, catalase, peroxidase dentre outras (Estrada, de Jesús Romero, Campa-Córdova, Luna & Ascencio, 2007; Raven, Evans & Korb, 1999). Também outros metais-traço como Zn, Mn, Ni, Cd ou Co, tem um papel menos substancial no crescimento do fitoplâncton em comparação com o ferro, embora sejam importantes para evitar os problemas de estresse oxidativo, porque formam parte de enzimas antioxidantes que diminuem os níveis de espécies geradoras de estresse oxidativo (Downs *et al.*, 2002; Grant, Graham, Frankland & Hinde, 2003). Em tal sentido, para as algas, especificamente nos cloroplastos, o ferro é um importante componente do aparato fotossintético, i. e. complexos de transferência eletrônica (fotossistemaII (PSII), fotossistema I (PSI)), complexo citocromo b6f e ferredoxinas) e é requerido para a biossíntese do cofator heme e dos clusters de ferro-enxofre (Blaby-Haas & Merchant, 2012; Iglíc, 2011). Apesar de sua alta abundância e demanda biológica, as concentrações de ferro dissolvidos nas águas marinhas superficiais (ambientes enriquecidos em oxigênio) são extremamente baixas (Butler, 1998). Devido às altas forças iônicas, pH próximo ao neutro ($\text{pH}_{\text{marinho}} \sim 8.1$) e condições aeróbicas, parâmetros que caracterizam a maioria dos habitats aquáticos, o ferro encontra-se em forma insolúvel (Liu & Millero, 2002a). Isso significa que as concentrações de ferro dissolvido estão nos níveis de nanomolar (Johnson, Michael Gordon & Coale, 1997). Por esse motivo, o ferro é um nutriente limitante, mas sua disponibilidade está influenciada por suas formas químicas, e as condições físico-químicas (potencial redox em combinação do pH) do meio induzem a reações redox, precipitação adsorção e complexação. Neste contexto, o ferro pode estar disponível tanto quanto Fe(II)

como Fe(III), e a maior parte de ferro não biodisponível se acha na forma de óxido férrico, hidróxido férrico amorfo e oxohidróxidos (mono-, oligo- e poliméricos). Embora esta disponibilidade esteja limitada predominantemente pela solubilidade do Fe(III), em pH perto do neutro e em presença de O₂ a forma mais estável é a forma oxo férrica ($K_{PSFe(OH)_3} = 2 \times 10^{-39}$) (Hunter & Boyd, 2007), fator esse que domina a especiação inorgânica de ferro na faixa de pH das águas marinhas. Por outro lado, a maior parte do ferro dissolvido (aproximadamente 99%) existe como Fe(III), lábil ou fortemente complexado ($K = 10^{19}$ a 10^{22} mol L⁻¹ (Butler, 1998)).

Embora existam diferentes formas de aumentar a solubilidade do ferro presente em solução, como por exemplo a diminuição da temperatura, do pH ou da salinidade, os microrganismos marinhos, particularmente os procariontes desenvolveram substâncias orgânicas extracelulares que melhoram a solubilidade e biodisponibilidade do ferro para sua assimilação. Dentre estes, os ligantes orgânicos, chamados também sideróforos (Morel, 2003; Vraspir & Butler, 2008), influenciam a dissolução do ferro formando complexos de coordenação com grupos de diferente natureza química que incluem funções orgânicas tipo hidroxamato, catecolato, carboxilato ou misturas de grupos funcionais (Khan, Singh & Srivastava, 2018) (**Figura 1**). Outra fonte provável de quelantes de ferro dá-se mediante a liberação de ligantes a partir de outros microrganismos por degradação celular (i. e. protoporfirinas) (Hogle, Cameron Thrash, Dupont & Barbeau, 2016; Roe, Hogle & Barbeau, 2013).

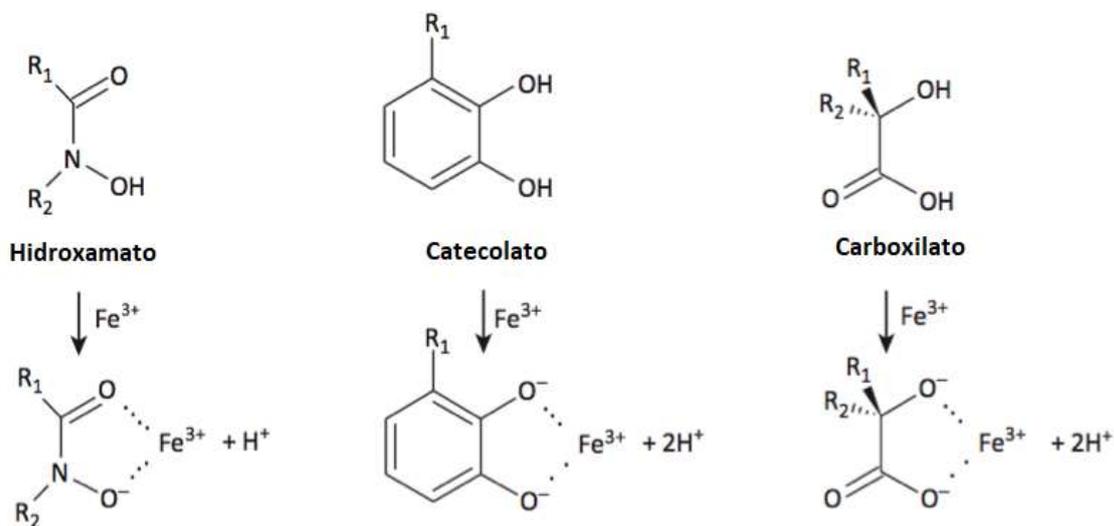


Figura 1. Grupos funcionais individuais de sideróforos e os complexos que formam com ferro(III). Os sideróforos se coordenam com o íon férrico mediante átomos doadores duros como oxigênio com alta densidade negativa ou neutro.

1.2 Transporte de ferro em microrganismos marinhos

O exposto anteriormente explica a baixa biodisponibilidade do ferro em ambientes altamente oxigenados onde a atividade fotossintética está presente, assim o ferro é um fator limitante para o crescimento dos produtores marinhos primários (Worms, Simon, Hassler & Wilkinson, 2006). Dado que o ferro pode gerar reações indesejadas i. e. reações de Fenton, os mecanismos específicos de captação e transporte, reciclagem e armazenamento de ferro estão estritamente regulados minimizando a toxicidade. Morel & Price (2003) *et al.* descrevem estratégias dos microrganismos marinhos para adquirir metais traço (ferro) mediante transportadores específicos.

Um efeito importante para biodisponibilizar ferro nos procariotos (autótrofos e heterótrofos) marinhos é reduzir o pH externo do meio, assim solubiliza o hidróxido férrico à uma forma relativamente mais solúvel. Outra estratégia é o uso de quelantes de alta afinidade (Krachler, Krachler, Valda & Keppler, 2019), para captar ferro. No entanto a captação de ferro mediada por sideróforos (Sid) ocorre mediante sistemas de transporte específicos na membrana celular para o complexo (Sid-Fe). Possivelmente, a maioria de microrganismos marinhos eucariotos, em lugar de sintetizar sideróforos para assimilar ferro *per se*, use um mecanismo acoplado mais eficiente e eficaz para acessar o ferro dissolvido e transportá-lo baseado na redução mediante transferência eletrônica seguida de absorção na superfície celular, pois assim pode obter ferro a partir diversas espécies complexadas com ligantes de estabilidade reduzida no oceano, diminuindo o custo de sintetizar moléculas complexas com alta afinidade por ferro (Shaked, Kustka & Morel, 2005). Para manter a homeostase do ferro mediante esta estratégia, as microalgas usam proteínas transportadoras disseminadas na bicapa lipídica (membranas celulares e organelas) (**Figura 2**). Esses transportadores representam a primeira linha de defesa para estabelecer a correta homeostase de metais a nível celular e subcelular. quando as reservas esgotam-se os transportadores proporcionam rotas específicas para distribuir e fornecer os cofatores necessários para evitar sintomas de deficiência. Em contraste, quando as concentrações intracelulares de metais excedem os níveis críticos, os transportadores conseguem expelir o excesso antes que ocorra a toxicidade (e. g. metais não quelados redox ativos como ferro que geram espécies reativas de oxigênio (Blaby-Haas & Merchant, 2012). Também a captura de presas é considerada outra forma vantajosa de adquirir ferro em ambientes com baixo conteúdo de nutrientes, existindo relatos de flagelados fotossintéticos que ingerem bactérias e ferro particulado (Nodwell & Price, 2001)

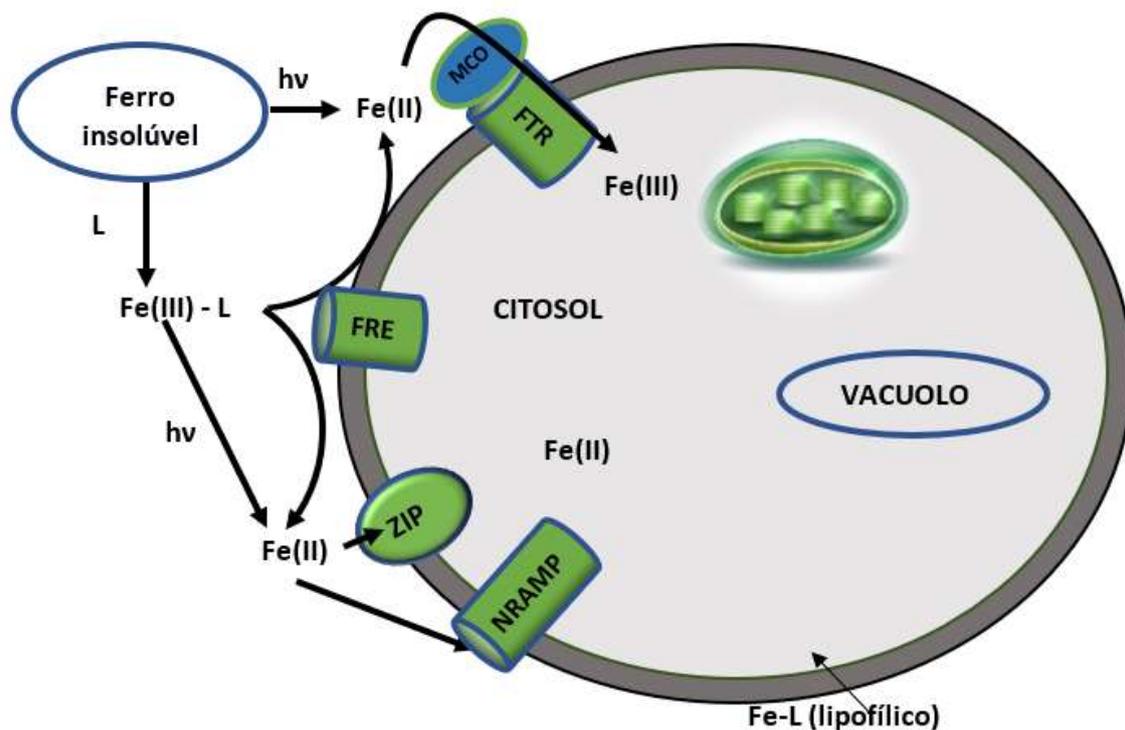


Figura 2. Diagrama simplificado que mostra diversos processos para transportar e internalizar duas formas químicas de ferro, Fe(II) e Fe(III), nas algas eucarióticas a partir de espécies químicas que envolvem a complexação de ferro. Devido ao forte ambiente oxidante pela presença de oxigênio a maior parte do ferro se acha de forma insolúvel (i. e. oxohidróxidos e coloides). O ferro biodisponível pode encontrar-se como Fe(III) unido com ligantes orgânicos (L). O íon ferroso (Fe(II)), é fornecido principalmente mediante deposição úmida ou foto redução do íon Fe(III) nas zonas mais superficiais do oceano. Em geral, o ferro unido a ligantes deve reduzir-se na membrana antes de ser absorvido pela célula. O íon ferroso pode-se assimilar mediante transportadores bivalentes não específicos, em outros casos também pode se reoxidar e transportar através de um sistema de captação de Fe(III), usando ferroxidases.

FRE: Ferrireductase; Complexo transportador de ferro de alta afinidade: 1) MCO: ferroxidase (multicobre) 2) FTR: Permease férrica; ZIP / NRAMP: Sistemas de transporte para ferro bivalente, hv = energia para provocar a foto redução.

Para examinar as respostas frente às perturbações da homeostase do ferro, e fornecer conhecimentos sobre o metabolismo do metal, para os estudos que monitoram o estado de excesso do ferro é simples de se conseguir, apenas adicionando íons de ferro ao meio de cultura, mas alcançar a limitação de ferro é relativamente difícil. A contaminação do metal em vidrarias ou em ingredientes do meio costuma ser suficiente para sustentar o crescimento da maioria dos organismos, porque esses nutrientes são necessários em pequenas quantidades. Muitos experimentalistas optaram por empregar quelantes de metal que são convenientes, mas notoriamente carecem de especificidade completa para um único íon metálico.

Os experimentos de cultivo de microalgas normalmente são levados a cabo usando um meio de cultivo tamponado onde a especiação do ferro (e outros metais) está controlada para mantê-lo de forma solúvel e evitar sua precipitação, por altas concentrações de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), um ligante hexadentado com alta constante de estabilidade ($\text{Log}\beta_{\text{Fe(III)}} = 25,1$ (Botebol *et al.*, 2014)). Os complexos metálicos são capazes de dissociar e reassociar, no tempo que leva para se difundir na superfície biológica. Em outros cenários, onde os estudos estão orientados a determinar os efeitos de baixa concentração de ferro, o uso do quelante desferroxamina ou HBED em excesso é útil para assegurar a não disponibilidade de ferro (Sanchez *et al.*, 2019; Weger, Lam, Wirtz, Walker & Treble, 2009).

1.3 Quelantes de ferro em medicina

Na medicina, o uso de moléculas produzidas naturalmente por bactérias, fungos, algumas gramíneas, ácidos húmicos e fúlvicos (componente orgânico de águas marinhas), ou sinteticamente com alta afinidade por ferro, chamados também sideróforos, estabilizam o ferro e o protegem de reações indesejadas (i. e. precipitação, reação de Fenton).

Dentre os usos dos sideróforos estão:

- 1) terapia de quelação para o tratamento de transtornos associados à sobrecarga de ferro, que conduz a transtornos cardíacos, hepáticos e neurodegenerativos (Mobarra *et al.*, 2016; Nuñez & Chana-Cuevas, 2018),
- 2) desenho de moléculas para o transporte efetivo do ferro e
- 3) desenvolvimento de técnicas de estudo do metabolismo de ferro para uma melhor compressão da assimilação nos seres vivos (Wu, Yang, Sun, Bao & Lin, 2020).

Os quelantes de ferro são quimicamente diversos. Tipicamente contêm átomos com alta densidade de carga como oxigênio, nitrogênio ou grupos doadores de enxofre. Os grupos que contêm oxigênio como doadores de elétrons têm preferência pelo íon Fe(III) de acordo com a teoria de Pearson, coordenando numa disposição preferencialmente octaédrica de alto spin. Os quelantes com maior afinidade pelo ferro são hexadentados complexando ferro em proporção 1:1 (ligante:metal), enquanto os quelantes tridentados ou bidentados formam complexos em proporção 2:1 e 3:1 respectivamente (Brittenham, 1992) (**Esquema 1**).

1.3.1 Quelantes hexadentados de ferro(III)

1.3.1.1 Deferoxamina B

ácido N-[5-[[4-[5-[acetil(hidroxi)amino]pentilamino]-4-oxobutanoil] - hidroxiamino]pentil]-N'-(5-aminopentil)-N'-hidroxibutanediamida (DFO): A deferoxamina (Desferal) é um sideróforo natural extraído da bactéria *Streptomyces pilosus* (Codd, Richardson-Sanchez, Telfer & Gotsbacher, 2018), pouco tóxico, clinicamente aprovado para uso, em forma de mesilato, em pacientes com sobrecarga de ferro. Os três grupos hidroxamato bidentados formam um complexo altamente estável e hidrofílico com Fe(III), chamado ferrioxamina B ($\log\beta_{\text{Fe(III)}} = 30,6$, $p[\text{Fe}] = 26,5$) (Anderegg, Eplattener & Schwarzenbach, 1963; Evers, D. Hancock, E. Martell & J. Motekaitis, 1989), numa relação molar de 1:1 de estrutura octaédrica, assim diminui notavelmente a atividade redox do ferro.

1.3.1.2 HBED

ácido N,N'-di(2-hidroxibenzil)etilenodiamina-N,N'-di(acético): O HBED é um quelante sintético pertencente à família dos aminopolicarboxilatos fenólicos, proposto como agente quelante de via oral para o tratamento da sobrecarga de ferro em humanos (Brittenham, 1992), e como alternativa para evitar a clorose em plantas (Nadal, García-Delgado, Hernández, López-Rayó & Lucena, 2012). Este quelante forma um complexo altamente estável em relação 1:1 (HBED:Fe(III)), em uma ampla faixa de pH = 3,5 – 12,0, com alta estabilidade ($\log\beta_{\text{Fe(III)}} = 39,01$; $p[\text{Fe}] = 31,1$) (Liu & Millero, 2002b; Ma, Motekaitis & Martell, 1994), formando ligações com os grupos fenolato, carboxilato e amino com ferro com uma afinidade nove vezes maior que o DFO (Eplattener, Murase & Martell, 1967). Este sideróforo tem mostrado alta afinidade por Fe(III), no entanto o complexo com Fe(II) é efêmero pois o HBED induz à oxidação rápida à forma férrica, inclusive em condições anaeróbicas (Samuni *et al.*, 2001).

1.3.2 Quelantes tridentados de ferro(III)

1.3.2.1 Deferasirox

ácido N,N'-di(2-hidroxibenzil)etilenodiamina-N,N'-di(acético) (DFX): Deferasirox (comercializado como EXJADE) é um quelante de ferro sintético usado oralmente em pacientes com sobrecarga de ferro e atualmente em terapias para câncer (Tury *et al.*, 2018). Pertence à classe de quelantes tridentados bis-hidroxifeniltriazóis N-substituídos,

formando um complexo lipofílico com Fe(III) numa proporção de 2:1 (DFX:Fe) ($\log\beta_{\text{Fe(III)}} = 38,6$; $p[\text{Fe}] = 22,5$) (Santos, 2008). Este sideróforo aquiral, apresenta alta lipoficidade atribuída aos anéis benzênicos na estrutura química, assim estudos *in vivo* demonstraram o dobro de eficácia para diminuir os níveis de ferro (não hemo) hepático, em comparação com DFO (Nick *et al.*, 2003).

1.3.3 Quelantes bidentados de ferro(III)

1.3.3.1 Deferiprona

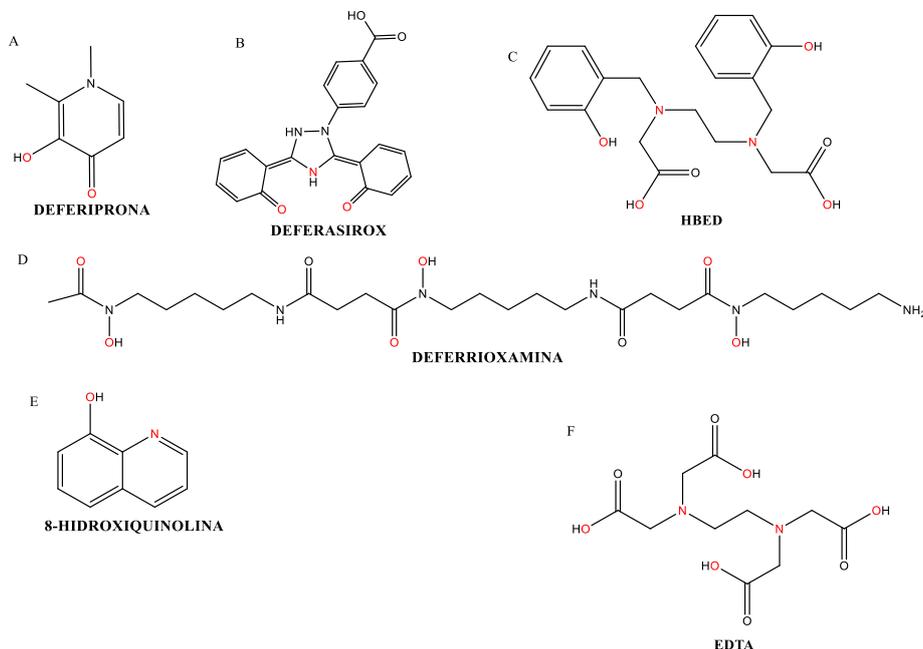
3-hidroxi-1,2-dimetilpiridin-4-ona (DFP): A deferiprona, conhecida também como L1 ou DMHP, pertence à família de quelantes bidentados 3-hidroxipiridin-4-ona. Comercializada como FerriproxTM, é uma molécula neutra e lipofílica pequena, que forma um complexo neutro vermelho DFP-Fe(III) numa proporção 3:1 ($p[\text{Fe}] = 19,2$) (Kontoghiorghes, 1987), estável tanto em soluções ácidas como básicas ($\text{pH} < 1$ e $\text{pH} > 12$). A capacidade de atravessar a membrana plasmática facilita o transporte de ferro, diminuindo a severidade de diversos transtornos relacionados com sobrecarga de ferro.

1.3.3.2 8-Hidroxiquinolina

quinolin-8-ol (8-HQ): É uma molécula de baixo peso molecular, lipofílica com alta capacidade para complexar metais, como resultado dessas propriedades químicas, estudos revelam que tem potencial aplicação em doenças associadas a transtornos neurodegenerativos originados por estresse oxidativo dependentes de ferro, atividade antifúngica, anticâncer e antibacteriana (Oliveri & Vecchio, 2016). A molécula 8-HQ possui dois sítios potenciais de coordenação com íons metálicos: um átomo de nitrogênio quinolínic e um átomo de oxigênio fenólico. Com o íon Fe(III) pode formar complexos com diferente relação estequiométrica, Fe(8-HQ), Fe(8-HQ)₂ e Fe(8-HQ)₃ dependendo do pH e da concentração do 8-HQ (Turnquist & Sandell, 1968). O complexo Fe(8-HQ), também lipofílico, tem a capacidade de atravessar as membranas celulares e distribuir-se em diferentes compartimentos (Jonas & Riley, 1991). Pode danificar o DNA, por ser um complexo citostático, cujos derivados têm capacidade de inibir células cancerosas e tumores *in vivo* (Shaw *et al.*, 2010).

Esta ampla variedade de quelantes é interessante para o presente trabalho, que consiste em usar uma estratégia de suplementação de ferro a partir de diferentes espécies químicas, para avaliar a efetividade dos diferentes quelantes para manter os requerimentos de ferro pela microalga. A via de assimilação do metal está influenciada pela

forma química do ferro (Fe(II), Fe(III), complexos de ferro orgânico ou inorgânico). Portanto a forma do ferro apresentada pode ter um efeito profundo sobre sua biodisponibilidade e, inclusive na resistência ou proliferação das microalgas a fatores externos, como por exemplo ao estresse térmico.



Esquema 1. Estruturas químicas de quelantes com alta afinidade pelo ferro. Os átomos em vermelho são os sítios de coordenação com ferro. **A.** (DFP) (3-hidroxi-1,2-dimetilpiridin-4-ona) **B** (DFX - EXJADE) (ácido N,N'-di(2-hidroxibenzil)etilenodiamina-N,N'-di(acético)) **C** ácido N,N'-di(2-hidroxibenzil)etilenodiamina-N,N'-di(acético) **D.** (DFO) ácido N-[5-[[4-[5-[acetyl(hidroxi)amino]pentilamino]-4-oxobutanoil]-hidroxiamino]pentil]-N'-(5-aminopentil)-N'-hidroxibutanediamida **E** (8-HQ - Oxina) (quinolin-8-ol) **F** (EDTA) ácido 2-[2-[bis(carboximetil)amino]etil-(carboximetil)amino]acético.

1.4 Symbiodiniaceae, Corais e ferro

Alguns dinoflagelados fotossintéticos pertencentes à família Symbiodiniaceae (também conhecidos por "Zooxantelas" ou "Simbiodinium") formam simbiose com organismos marinhos pertencentes a diversos filis do reino *Animalia* como *Porifera*, *Cnidaria*, *Mollusca* e *Platyhelminthes*. Também se encontram associados com protistas - foraminíferos (Stat, Carter & Hoegh-guldberg, 2006) e a algumas macroalgas (Porto, Granados, Restrepo & Sánchez, 2008; Venera-Ponton, Diaz-Pulido, Rodriguez-Lanetty & Hoegh-Guldberg, 2010).

Os recifes coralíneos são ecossistemas marinhos tropicais importantes, não só pela vida que sustentam (os corais liberam muco rico em lipídeos e proteínas, que serve de alimento para peixes e outros animais) mas também porque é um recurso vital para a

economia e culturalmente (Hoegh-Guldberg, Pendleton & Kaup, 2019). O sucesso da sua persistência em águas tropicais com poucos nutrientes está na simbiose formada entre o animal e os dinoflagelados da família Symbiodiniaceae, baseada no intercâmbio de produtos da fotossíntese e respiração celular além da proteção das microalgas frente a condições ambientais e de predadores. Adicionalmente, uma série de outros microrganismos associam-se ao coral como bactérias, arqueas, vírus e fungos com funções de proteção e manutenção da homeostase (Peixoto, Rosado, Leite, Rosado & Bourne, 2017).

Dentro dos cnidários, as microalgas encontram-se em sua forma cocóide (forma fixa) rodeada por uma membrana que se origina da membrana plasmática da célula hospedeiro (célula gastrodérmica) durante a fagocitose, denominada simbiossomo, a qual permite regular a entrada de moléculas orgânicas e inorgânicas que permitem o crescimento e a proliferação do holobionte (**Figura 3A - C**). Anteriormente, a classificação dos dinoflagelados pertencentes à família Symbiodiniaceae foram classificados em nove clados (A – I) (Pochon & Gates, 2010).

No entanto, atualmente a taxonomia da família Symbiodiniaceae foi reavaliada filogeneticamente, reconhecendo-se uma série de gêneros que compreendem: *Symbiodinium*, *Breviolum*, *Cladocopium*, *Durusdinium*, *Fugacium*, *Gerakladium*, que abarcam os filotipos A – G respectivamente (Chauka, 2013; LaJeunesse et al., 2018; Pochon & Gates, 2010; Sanqiang, Fengli, & Zhiyong, 2018), *Freudenthalidium* e *Hallaxium* pertencentes às denominações anteriores Fr3 e filotipo H respectivamente (Nitschke et al., 2020).

Estudos da zooxantela na forma livre (fora do hospedeiro) relacionados ao ferro como micronutriente e sua ação contra o estresse originado pelas mudanças ambientais são relativamente escassos.

Estudos feitos em corais e zooxantelas expostos ao ferro livre e/ou em combinação com outros metais biologicamente ativos apresentam efeitos que dependem majoritariamente da concentração de ferro biodisponível. Portanto, o aumento de ferro conduz a maiores taxas de crescimento e maior internalização de ferro (Ferrier-Pagès, Schoelzke, Jaubert, Muscatine & Hoegh-Guldberg, 2001; Reich, Rodriguez, LaJeunesse & Ho, 2020; Rodriguez, Lin, Ho & Ho, 2016).

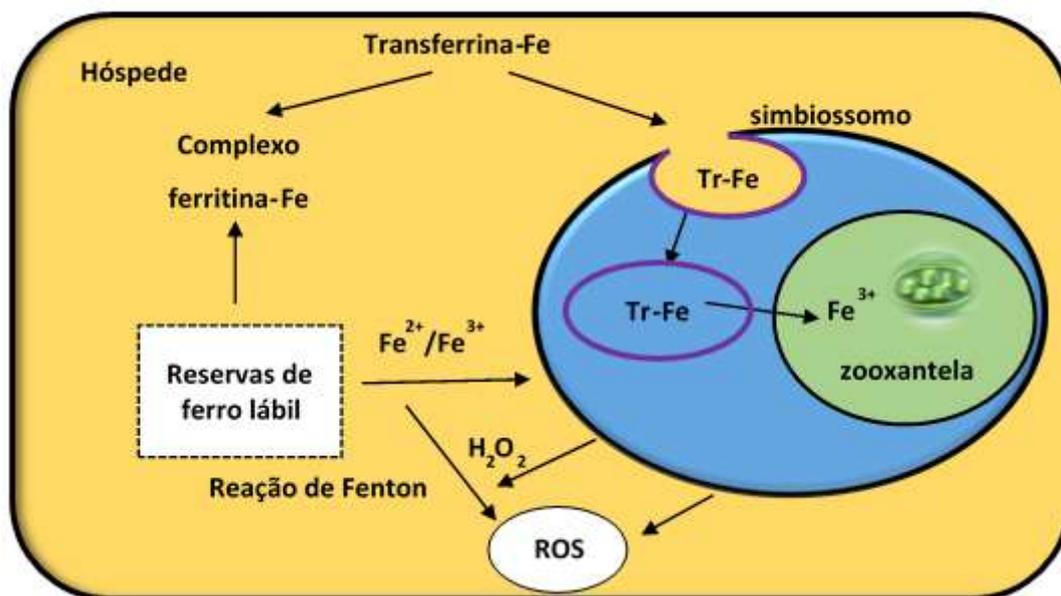


Figura 3. **A** Pólipo de *Aiptasia pallida* mostrando a coloração marrom característica, conferida pelos pigmentos fotossintéticos da zooxantela. **B** Tentáculos do pólipo contendo centenas de células individuais da família Symbiodiniaceae dentro do tecido gastrodérmico (o tecido epidérmico não contém simbiontes e é visível como a fina camada transparente na periferia do tentáculo) **C** A falta de autofluorescência da clorofila no extremo do tentáculo confirma a distribuição gastrodérmica das zooxantelas. **D** Representação da assimilação de ferro em zooxantelas simbióticas (provavelmente o ferro depende do fornecimento do hospedeiro). Dentro da célula do hospedeiro o ferro circula ligado à transferrina e pode ser armazenado majoritariamente na ferritina, para reduzir a possibilidade de iniciar reações que desencadeiam a produção espontânea de EROs via reação de Fenton, e reservas de ferro lábil. A mobilização de ferro através do simbiossomo dá-se mediante endocitose do complexo ferritina-ferro (Song *et al.*, 2015).

Por outro lado ambientes suscetíveis a aumentos de temperatura provocam a diminuição de rendimento da fotossíntese (indicador do fenômeno do branqueamento), produzindo dano oxidativo e alterando a coloração dos organismos endossimbióticos, alterações nos sistemas antioxidantes cujos efeitos se agravam com deficiência de ferro (Shick *et al.*, 2011) e outros metais traço (Wells, 2011)

Adicionalmente, estudos orientados à zooxantela formando simbiose conjecturaram que a transferrina mobiliza ferro do plasma mediante endocitose através do simbiossomo e transporte por proteínas específicas até o dinoflagelado. O ferro pode ser armazenado (ferritina) para usos posteriores, no entanto este mecanismo se inibe frente ao aumento de temperatura, induzindo a deficiência de ferro às microalgas cujo efeito que pode agravar o branqueamento. Também se comparam os efeitos de limitação de ferro entre zooxantela de vida livre e formando simbiose, cujos efeitos foram mais marcados nas microalgas de vida livre (**Figura 3D**) (Song *et al.*, 2015).

Pelo exposto anteriormente, na literatura a informação é escassa, relacionada à exposição a distintas concentrações de ferro complexado com ligantes específicos, e a relação que tais compostos teriam nas respostas fisiológicas sobre as espécies da família Symbiodiniaceae. Em última análise, qual seria a relação dos níveis de complexos bem caracterizados de ferro com o aumento da resiliência frente ao fenômeno de branqueamento dos corais?

1.5 Estresse oxidativo e branqueamento coralíneo

Os recifes coralíneos são o habitat de um terço de todas as espécies marinhas, no entanto um terço das espécies coralinas estão em perigo de extinção (Hughes *et al.*, 2017). A relação entre a zooxantelas e seus hospedeiros não só determina a velocidade de crescimento do recife coralíneo (i. e. formação do esqueleto calcário), mas também como o sistema responde ao estresse ambiental. Diversas pesquisas mostram que esta relação mutualista é suscetível a estressores ambientais especialmente a episódios de aumento de temperatura, luz, salinidade entre outros (Davy, Allemand & Weis, 2012). O branqueamento é uma ruptura da associação endossimbiótica dos corais e os dinoflagelados pertencentes a família Symbiodiniaceae; ou seja uma ejeção da microalga, que normalmente é o organismo pigmentado fotossintético, resultando na perda da cor do coral (**Figura 4**). Em geral, passado o estresse os corais recuperam as microalgas, porém, se for muito duradouro essas mudanças abruptas na densidade celular dentro do tecido do -hospedeiro geram uma variedade de problemas. Assim baixos níveis de mi-

croalgas podem provocar inanição dos corais, que podem adquirir doenças por patógenos e inclusive chegar à morte. Este problema ocorre com maior frequência em recifes de coral, uma vez que esta simbiose é o motor biológico dos recifes. Este é um dos maiores problemas ambientais modernos, devido às mudanças climáticas (com o aumento de temperatura em águas marinhas) e impactos antropogênicos. A produção dos EROs aumenta tanto em células dos corais como nas simbióticas, em como consequência das altas temperaturas. O aumento da produção de EROs se filtram ao hospedeiro o que provoca dano celular e apoptoses nas células do coral. A evidência do estresse por calor foi observada pela primeira vez na década de 1930, embora um evento grande de branqueamento ocorreu no 1998 (Baird & Marshall, 1998; R., W., M., & K., 2002) com uma urgência de realizar estudos por ação da temperatura. Os esforços atuais centram-se em examinar as consequências do estresse pelo calor, além de encontrar estratégias para melhorar a tolerância térmica e/ou resiliência e assim ajudar os recifes coralíneos a sobreviver a eventos climáticos futuros.



Figura 4 Efeito visual de um coral antes e depois do branqueamento. Esquerda: Aparência branca de coral pela perda das zooxantelas como resposta ao estresse submetido. A descoloração do coral tem como consequências a perda de grandes extensões de habitats marinhos. Direita: Um coral com aparência saudável e colorida com zooxantelas. (<https://www.publico.pt/2017/08/27/infografia/corais-em-stress-234>)

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Apesar de o ferro ser um dos elementos mais abundantes no planeta, sua biodisponibilidade é muito baixa nos oceanos. Este elemento traço é necessário para diversas vias metabólicas e processos celulares, especialmente em microrganismos fotossintéticos marinhos. Portanto, a hipótese deste trabalho é que o uso de complexos de ferro(III) com características químicas conhecidas pode promover o desenvolvimento das zooxantelas e com isso, aumentar a resiliência dos corais simbioss frente ao fenômeno do branqueamento.

O objetivo geral consiste em responder à primeira parte dessa hipótese, determinando a atividade de complexos de ferro(III) sobre dinoflagelados pertencentes à família Symbiodiniaceae.

Para responder ao objetivo geral propuseram-se os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o crescimento das diferentes espécies de zooxantelas da família Symbiodiniaceae expostas aos diferentes complexos de ferro(III).
- Verificar a assimilação de ferro em espécies da família Symbiodiniaceae.
- Determinar as taxas de crescimento para a espécie *Breviolum minutum* exposta a diferentes complexos de ferro(III), sob estresse de temperatura.
- Avaliar a toxicidade do complexo Fe(8-HQ) em *Durusdinium glynni*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Organismos

As seis espécies de microalgas utilizadas neste trabalho têm a seguinte classificação taxonômica (LaJeunesse, 2017; LaJeunesse *et al.*, 2018):

- Império : Eukaryota
- Reino : Chromista
- Filo : Miozoa
- Superclasse : Dinoflagellata
- Classe : Dinophyceae
- Ordem : Suessiales
- Família : Symbiodiniaceae
- Espécies:
 - : *Symbiodinium microadriaticum*
 - : *Breviolum minutum*
 - : *Cladocopium goreau*
 - : *Durusdinium glynni*
 - : *Effrenium voratum*
 - : *Fugacium kawagutii*

Para os experimentos de resposta das diferentes microalgas frente aos complexos de ferro, foram utilizados cultivos em fase exponencial de crescimento, quando a condição fisiológica da população é mais vigorosa. Todo o material utilizado nos cultivos e na preparação dos mesmos foi devidamente lavado com detergente neutro (1%), mantido em contato com ácido clorídrico (HCl) à 10% por um período de 24 horas, lavado em água corrente da torneira e depois por duas vezes em água destilada, seguido de secagem em estufa a 60°C. Antes do preparo de um novo cultivo, o material foi esterilizado em autoclave (121°C, 1 atm, 40 minutos) e seco em estufa a 60°C (Kawachi e Noël, 2005). As cepas da família Symbiodinaceae usadas nesta pesquisa foram cultivadas no Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (**BMAK**) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO USP), sob a supervisão da Dra. Flávia Saldanha-Corrêa.

3.2 Preparação dos complexos de ferro(III)

Complexos de ferro(III) com os quelantes deferiprona (DFP), deferasirox (DFX), ácido N,N'-di(2-hidroxibenzil)etilenodiamina-N,N'-di(acético) (HBED) e 8-hidroxiquinolina (8-HQ) (**Figura 5**), foram preparados *in situ* mediante a reação direta com sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e soluções dos ligantes em DMSO, enquanto os complexos com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e deferoxamina (DFO) foram sintetizados em meio aquoso (pH = 5,5). Finalmente todos os complexos foram incubados por 3 horas a 37°C (**Figura 6A**).

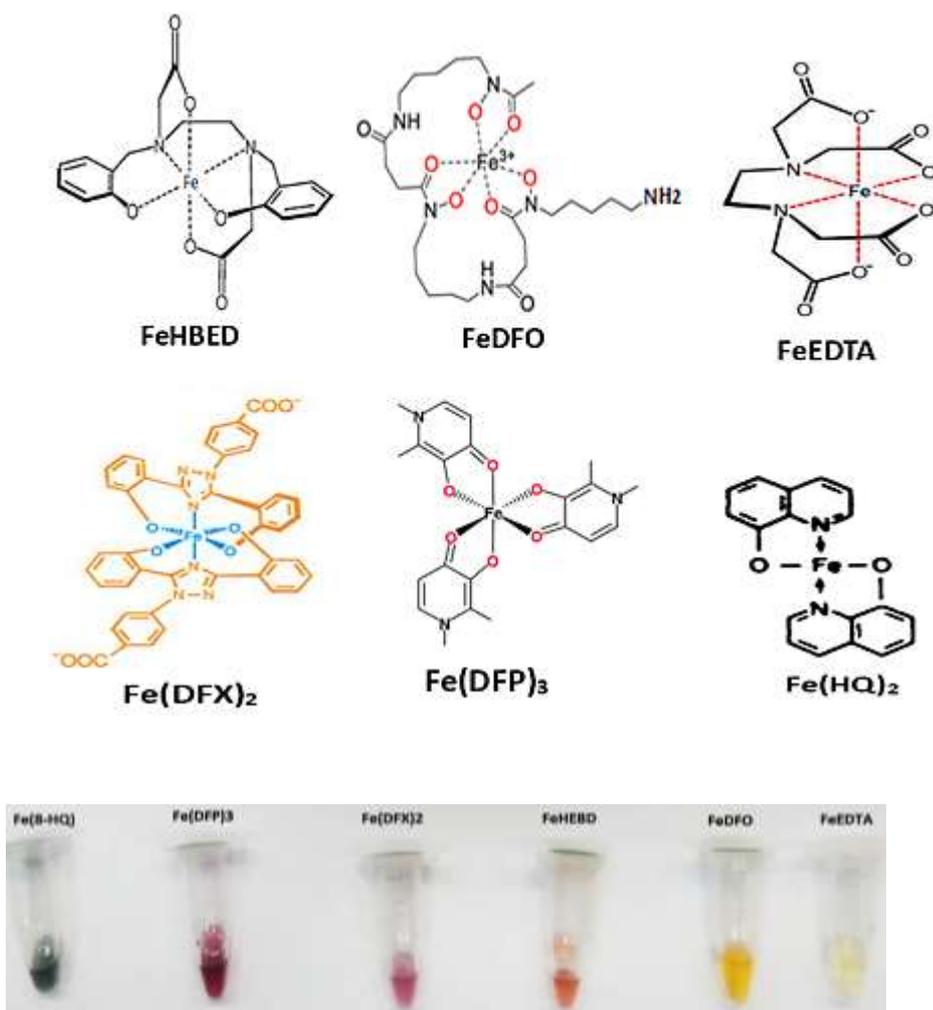


Figura 5. Estrutura química dos complexos de ferro(III) e aparência física dos complexos de ferro sintetizados *in situ*.

3.3 Caracterização dos complexos de ferro mediante análises por espectroscopia UV/VIS

Os complexos de ferro foram preparados nas condições expostas acima utilizando FeCl_3 como fonte de ferro (**Figura 6A**). Os espectros de absorção dos quelantes em presença ou ausência de ferro foram registrados em leitor de microplacas SpectraMax M4 (Molecular Devices) a 23 °C. Após 24 horas de repouso no escuro, as estequiometrias dos complexos foram determinadas por titulação espectrofotométrica (**Figura 6B**).

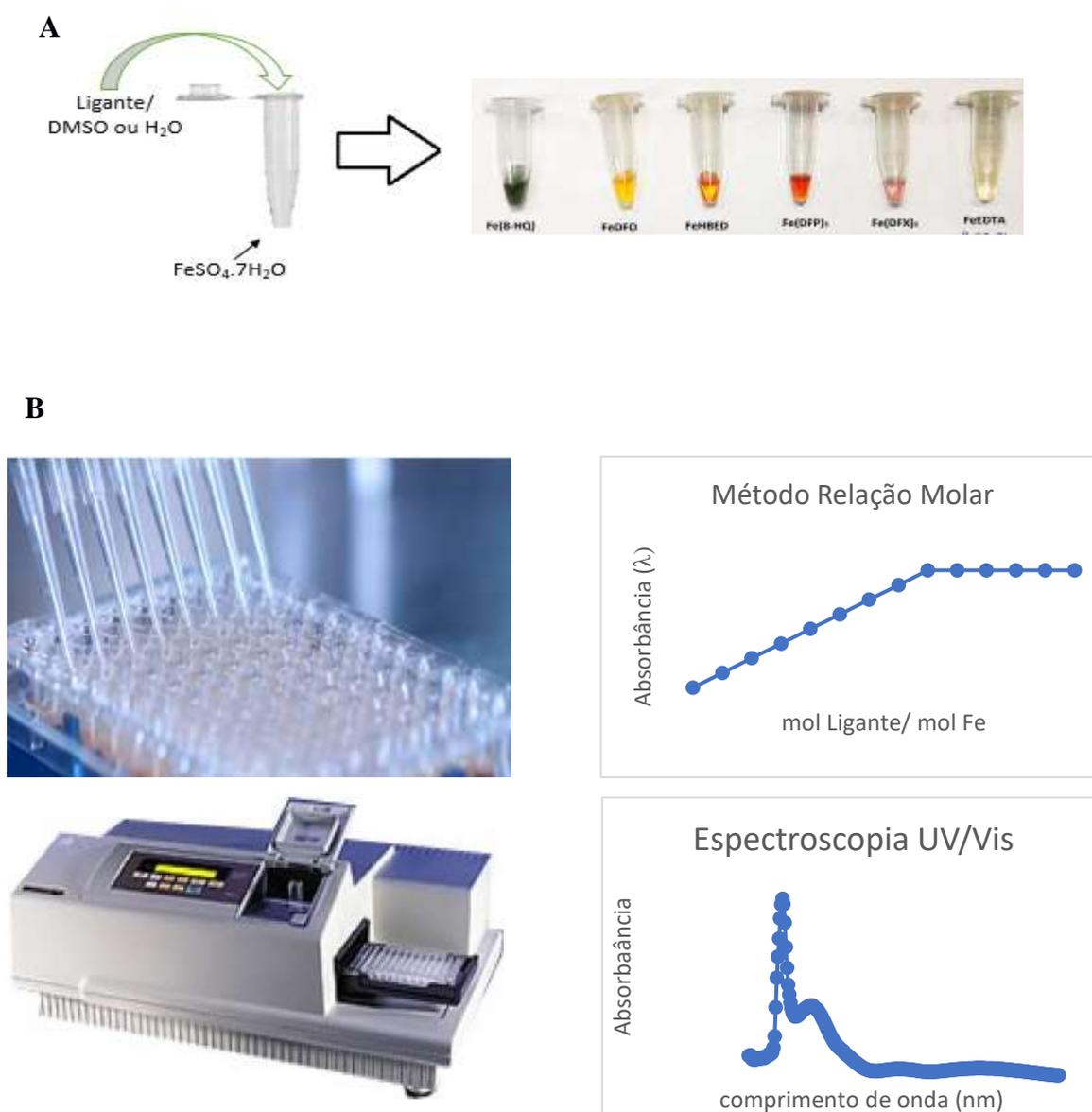


Figura 6 A. Esquema da síntese *in situ* dos complexos de ferro(III). **B.** Montagem da placa para determinar a estequiometria dos complexos mediante o método da relação molar.

3.4 Pré-cultivo das espécies da família Symbiodiniaceae no meio Guillard F/2 isento de ferro

Inóculos das cinco espécies utilizadas nos ensaios (*Symbiodinium microadriaticum*, *Breviolum minutum*, *Cladocopium goreau*, *Effrenium voratum* e *Fugacium kawagutii*) foram semeados em erlenmeyers de vidro com capacidade de 100 mL contendo 90 mL de meio de cultura Guillard - F/2 sem suplementação do ferro (**Figura 7A**) preparado com água do mar autoclavada conforme os protocolos de preparação (Guillard, 1975). Os cultivos foram mantidos sob condições de temperatura de 23 °C, iluminação de 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (providas por lâmpadas tipo luz do dia) em um fotoperíodo de 12:12 h (**Figura 7B**). O crescimento dos cultivos foi monitorado mediante visualização e contagem direta por microscopia usando hemocitômetros (tipo Nageotte ou Fuchs-Rosenthal dependendo da densidade da cultura) durante um período de 21 dias. Para atingir populações ótimas e iniciar os experimentos de exposição aos complexos de ferro a partir de alíquotas de 1 mL, (concentração final = 10^4 cel mL^{-1} no momento de iniciado o semeado com os tratamentos de ferro) se esperaram diversos tempos. Para as espécies *Cladocopium goreau* e *Effrenium voratum*, o tempo de espera para tomar amostras e iniciar os experimentos posteriores estiveram num período de tempo compreendido entre 24 a 28 dias. Para as espécies *Symbiodinium microadriaticum*, *Breviolum minutum* e *Fugacium kawagutii*, teve-se que adicionar alíquotas de meio Guillard – F/2 livre de ferro para aumentar a taxa de crescimento e continuem a fase exponencial, para assim atingir uma ótima população até aproximadamente 50 dias, após o semeado.

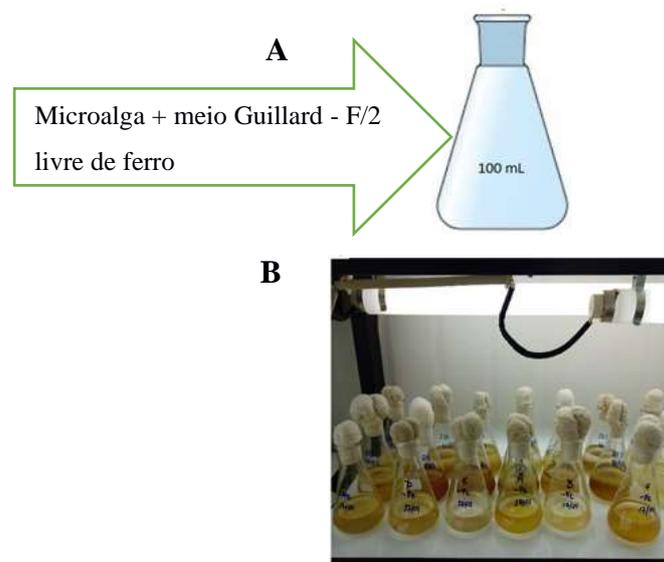


Figura 7 A. Esquema da semeadura das diferentes espécies da família Symbiodiniaceae no meio de cultura livre de ferro. **B.** Condições de trabalho no laboratório para o cultivo das microalgas no meio livre de ferro.

3.5 Monitoramento da variação da população e determinação da velocidade de crescimento das espécies da família Symbiodiniaceae frente aos complexos do ferro(III)

Para determinar o efeito da especiação química do ferro foram coletados inóculos de aproximadamente 1 mL na fase exponencial de crescimento das cinco espécies descritas no **item 3.1**, provenientes de uma cultura-mãe sem suplementação de ferro, foram semeadas em tubos de borossilicato (população inicial de 10^4 cel mL⁻¹) até um volume final de 30 mL em meio Guillard – F/2 livre de ferro preparado com água do mar autoclavada e salinidade 35. Todos os cultivos foram feitos em triplicata.

Em seguida adicionou-se 35,1 µL dos diferentes complexos de ferro (10 mmol L⁻¹): sulfato ferroso heptahidratado (Fe(II) – considerado a forma mais biodisponível e solúvel de ferro), Fe(DFP)₃, Fe(DFX)₂, FeDFO, FeHBED até uma concentração final de 11,7 µmol L⁻¹. Como controles foram utilizados dois conjuntos triplicatas. No primeiro, adicionou-se DMSO (0,12 % v v⁻¹) e ao segundo conjunto 35,1 µL de meio livre de ferro (sem adição de ferro). O mesmo procedimento foi usado para verificar o efeito dos ligantes livres suplementando com DFX, DFP, DFO e HBED com concentrações finais 20, 30, 10 e 10 µmol L⁻¹ respectivamente (n = 1). Os cultivos foram realizados nas mesmas condições de luz e temperatura que os cultivos-mãe. A variação da população das diferentes espécies foi monitorada nos dias 1, 5, 9, 15, 19 e 21 de experimento, determinando a concentração de células por mL em câmaras de contagem (Nageotte e Fuchs-Rosenthal) coletadas na fase diurna do ciclo diurno:noturno. Antes de iniciar cada contagem e assegurar uma distribuição uniforme dos dinoflagelados no cultivo, os tubos foram homogeneizados até obter células individuais e amostrados com pipetas Pasteur autoclavadas, tendo-se cuidado de eliminar as agrupações de células.

As taxas de crescimento por dia (μ) foram avaliadas na fase exponencial de crescimento, determinadas por ajuste-linear da equação $\ln y = \ln A + \mu t$ (y e A representam a população no tempo t e tempo inicial respectivamente), a partir do início da fase exponencial de crescimento usando os algoritmos do programa GraphPad Prism 7.0.

3.6 Determinação do ferro intracelular nas espécies da família Symbiodiniaceae por absorção atômica

Para determinar e avaliar o teor de ferro intracelular entre espécies no dia 21 do experimento mencionado no **item 3.5** e assim complementar a informação em relação aos dados das curvas de crescimento para os respectivos tratamentos, os cultivos foram homogeneizados mediante agitação usando pipetas Pasteur. Alíquotas de 10 ou 15 mL (dependendo da densidade do cultivo) de suspensões das diferentes espécies foram colocadas em tubos e centrifugados a 375 rcf durante 5 minutos, para concentrar microalgas as microalgas. Após retirar o sobrenadante, o pellet foi lavado com solução buffer livre de ferro - HBS/Chelex (pH = 7,40, salinidade: 35) duas vezes suplementado com DTPA 1 mmol L⁻¹ para retirar o ferro que pode permanecer na membrana celular externa. Após a lavagem, o pellet foi seco em estufa a 60 °C por um período de 12 horas.

O pellet seco foi tratado com 300 µL de HNO₃ concentrado bidestilado em banho-maria a 80 °C. Após eliminar os gases, adicionou-se 150 µL de H₂O₂, e diluiu-se a 10 mL com água deionizada. Em paralelo, preparou-se um branco sem as microalgas mediante o procedimento anterior.

A determinação da concentração total de ferro nas amostras foi realizada em um espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite em colaboração com a Profa. Dra Cassiana Seimi Nomura (IQUSP). O experimento foi realizado no equipamento de forno de grafite (GF AAS), modelo ZEEnit 60 (AnalytikJenaAG, Jena, Alemanha), dotado de lâmpadas de cátodo oco, corretor de fundo baseado no efeito Zeeman com campo variável e amostrador automático, modelo MPE60, do mesmo fabricante. Argônio com pureza 99,998% v v⁻¹ (Oxilúmen, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como gás de proteção do tubo de grafite. As soluções analíticas de referência foram preparadas a partir de soluções estoques contendo 1000 mg L⁻¹ de ferro (FeCl₃) Titrisol (Merck KgaA). A curva de calibração foi preparada em uma faixa de concentração de 2 a 10 µg L⁻¹. O comprimento de onda selecionado foi de 248,3 nm, corrente da lâmpada de 4 mA e largura da fenda de 0,8 nm. O programa de aquecimento estabelecido para as determinações de ferro encontra-se descrito na **Tabela 1**. Os resultados de ferro total intracelular obtidos foram normalizados em função ao número de células coletadas no dia 21.

Tabela 1. Programa de aquecimento para determinação de Fe por GF AAS

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)
Secagem	130	10	30
Pirólise	1000	100	20
Atomização	2500	Full power	5
Limpeza	2700	Full power	3

3.7 Efeito do choque térmico na variação da população do *Breviolum minutum* exposto aos complexos de ferro(III).

Amostras da espécie *B. minutum* (aproximadamente 1 mL) provenientes de uma cultura sem suplementação de ferro foram semeadas (n = 3) em tubos de borossilicato (população inicial de 10⁴ cel.mL⁻¹) até um volume final de 30 mL de meio Guillard – F/2 livre de ferro. Dois protocolos de choque térmico foram testados.

No primeiro, a espécie foi exposta aos tratamentos de ferro (Fe(II), Fe(DFP)₃, Fe(DFX)₂, FeDFO, FeHBED e FeEDTA), DMSO (0,12 % v.v⁻¹) e um branco (sem adição de ferro) para aclimação e adaptação (concentração final = 11,7 µmol L⁻¹) durante 7 dias com condições de temperatura controlada a 20 – 23 °C, iluminação de 80 µE m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12:12 h. Após esse período de tempo, a microalga foi exposta ao choque térmico (+) por um período de 4 horas com controle de temperatura a 34 ± 1 °C para induzir estresse térmico. O grupo controle, sem choque térmico (-), permaneceu nas mesmas condições, mas mantido a 21 ± 1 °C, seguido de uma reversão da temperatura a condições de cultivo habituais que durou uma semana.

No segundo experimento foi feita a exposição da microalga aos complexos de ferro(III) após o choque térmico, seguindo o mesmo procedimento mencionado antes, além também se considerou um grupo controle sem choque térmico (-). A densidade de células e as taxas de crescimento µ (dia⁻¹) foram monitoradas no dia 1 e 7 antes e depois do tratamento do choque térmico mediante o procedimento descrito no **item 3.5 (Figura 8)** devido a que podem se formar espécies químicas tóxicas pela decomposição das células mortas provenientes depois do choque térmico em combinação com os complexos. Por outro lado, antes de realizar os experimentos avaliou-se o gradiente de temperatura em diversos pontos das bandejas do trabalho, para ter certeza do início das quatro horas de exposição ao choque térmico.



B



C

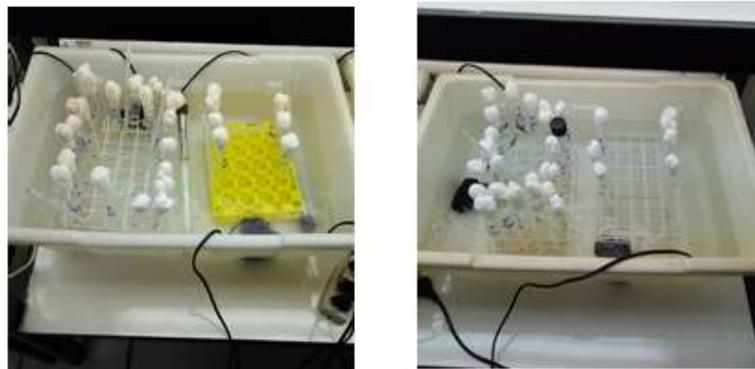


Figura 8 A. Montagem experimental para o estudo do “Efeito do choque térmico em *Breviolum minutum*” exposto aos complexos de ferro(III). A) Condições de cultivo para as espécies da família Symbiodiniaceae no meio F/2 – Guillard sem suplementação de ferro **B.** Modo de cultivo dos tubos contendo os cultivos de *Breviolum minutum* imersos em água prévio ao choque térmico **C** Montagem do experimento para avaliar o efeito do choque térmico em *Breviolum minutum*. Se utilizaram termostatos com aquecedor para elevar a temperatura e, para evitar que a temperatura se focalize em pontos próximos aos termostatos, se empregaram bombas de circulação para homogeneizar a temperatura dentro das bandejas.

3.8 Teste de toxicidade do complexo Fe(8-HQ) para espécie *Durusdinium glynni*.

Em placas de 24 poços com fundo transparente foram adicionados 10^5 cel mL⁻¹ da espécie *D. glynni*, (aproximadamente 1 mL do cultivo) provenientes de uma cultura em meio Guillard – F/2 coletados na fase exponencial de crescimento. Foram suplementados com o complexo Fe(8-HQ) nas concentrações finais de 50, 30, 20, 10, 5 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Duas filas de poços foram utilizadas como controles. Ao primeiro controle se adicionou DMSO (0,1 % v v⁻¹), o segundo controle não teve suplementação. A variação da população do *Durusdinium glynni* foi monitorada durante 1, 24, 36 e 48 horas medindo-se a densidade da cultura em câmaras de contagem (Nageotte e Fuchs-Rosenthal). O experimento foi feito em triplicata (**Figura 9**)

Durusdinium glynni. (1 mL de amostra por poço)

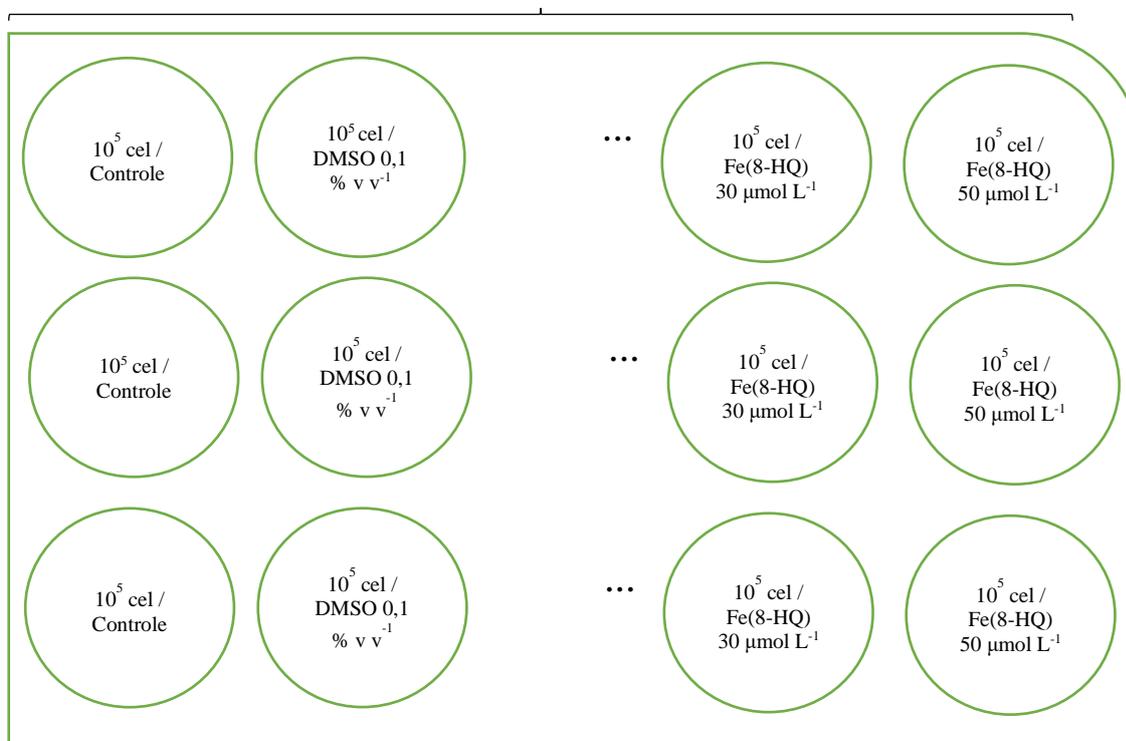


Figura 9 Esquema de montagem da placa para determinar toxicidade do complexo Fe(8-HQ) com concentrações de 50 a 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em *Durusdinium glynni*.

3.9 Determinação do coeficiente de partição de complexos de ferro(III)

Dentre as características mais relevantes dos compostos com ação farmacológica é o comportamento frente às membranas biológicas. Com objetivo de estimar o transporte, distribuição e destino dos complexos, a lipofilicidade é considerada como um parâmetro do fármaco que reflete sua atividade biológica, e comumente expressa-se como o coeficiente de partição entre a fase n-octanol e aquosa ($\text{Log}P_{o/w}$). Para determinar o coeficiente de partição ($\text{log}P_{o/w}$) dos complexos de ferro se usou o método “shake-flask” (“Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method,” 1995).

Inicialmente o n-octanol foi saturado com água mediante agitação mecânica durante 24 horas. De forma similar foi realizado o procedimento para saturar a água com n-octanol. Depois as soluções ficaram em repouso por 24 horas para separação total de fases. Previamente aos testes, realizou-se a determinação da faixa de concentrações dos complexos que respeitam a lei de Lambert-Beer dissolvidos na fase aquosa saturada com n-octanol.

Os complexos estudados foram preparados em DMSO até uma concentração final de 1 mmol L^{-1} , em seguida $100 \mu\text{L}$ de complexo foram diluídos em $200 \mu\text{L}$ de fase aquosa, essa solução resultante foi logo equilibrada com $200 \mu\text{L}$ de n-octanol. O mesmo procedimento foi feito para um controle de DMSO ou água. Em seguida, agitaram-se as soluções em vórtex durante 20 minutos seguido de centrifugação a 2350 rcf (5000 RPM) durante 5 minutos e deixado em repouso durante 1 hora para a separação das fases. De acordo a diretriz, é melhor testar ao menos três relações de volumes diferentes. Assim a relação de fases (V_o/V_w) variou de 1:1; 1:2 e 2:1, além cada proporção foi provada em duplicata

Após o tempo indicado, $100 \mu\text{L}$ da fase aquosa foram colocados em placas de 96 poços para leitura de absorvância no equipamento Spectra Max M4 a um comprimento de onda específico para cada complexo (**Tabela 2**) para determinar a concentração do soluto na fase aquosa a $23 \text{ }^\circ\text{C}$. A determinação do coeficiente de partição foi feita mediante a equação 1

$$P_{o/w} = \frac{C_{\text{inicial}} - C_w}{C_w} \quad (\text{Equação 1})$$

onde C_{inicial} = Concentração do complexo na solução inicial, C_w = Concentração do complexo na fase aquosa.

3.10 Análise Estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata exceto para os testes com quelantes. Antes de selecionar o método de análise estatística apropriado, um teste preliminar para determinar a normalidade dos dados foi feito aplicando o teste de Shapiro-Wilk. Os gráficos dos dados e a determinação da homogeneidade das variâncias e diferenças entre tratamentos foi feito mediante o teste ANOVA de uma via seguido do *post hoc* Tukey (HSD) usando as ferramentas estatísticas do programa GraphPad Prism versão 7.00. O nível de significância de todos os testes estatísticos e comparações foram para um valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espectroscopia eletrônica UV/Vis dos complexos de ferro

Os espectros de absorção dos ligantes e complexos de ferro(III) apresentam-se nas **figuras 10-15**. Variando-se a concentração de ligantes em cada determinação espectroscópica, é possível construir curvas de titulação fotométrica, também apresentadas nas mesmas figuras. As estequiometrias de ligação com ferro e os máximos de absorção são mostrados na **Tabela 2**.

Os espectros de absorção para os quelantes dissolvidos em DMSO ou água não apresentam bandas de absorção na zona visível do espectro, mas os complexos formados exibem bandas intensas na região 400 a 750 nm. Conhecendo λ_{\max} correspondente à formação dos complexos (bandas que não se encontraram em ligantes e solventes) determinou-se a relação ferro:ligante dos complexos sintetizados (**Figuras 10A - 15A**). Os complexos sintetizados apresentam padrões similares de bandas na região visível do espectro, com exceção do complexo FeEDTA (que apresenta uma banda na região do UV), atribuídas principalmente a transições eletrônicas permitidas pelo spin entre orbitais não ligados e orbitais d^5 do ferro(III) denominado transferência de carga ligante - metal (**TCLM**), conforme veremos a seguir.

Tabela 2 Resultados do método relação molar para determinar a estequiometria mediante titulação fotométrica na região UV - Vis dos complexos de Fe(III). A determinação dos complexos Fe(8-HQ), Fe(DFP)₃, Fe(DFX)₂ e FeHBED foram em dimetilsulfóxido (DMSO), e os complexos FeDFO e FeEDTA em meio aquoso (pH = 5,5).

Complexo	λ_{\max} (nm)	Razão molar (L:Fe)
Fe(8-HQ)	620	2:1
Fe(DFP) ₃	514	3:1
Fe(DFX) ₂	510	2:1
FeHBED	480	1:1
FeDFO	430	1:1
FeEDTA	284	1:1

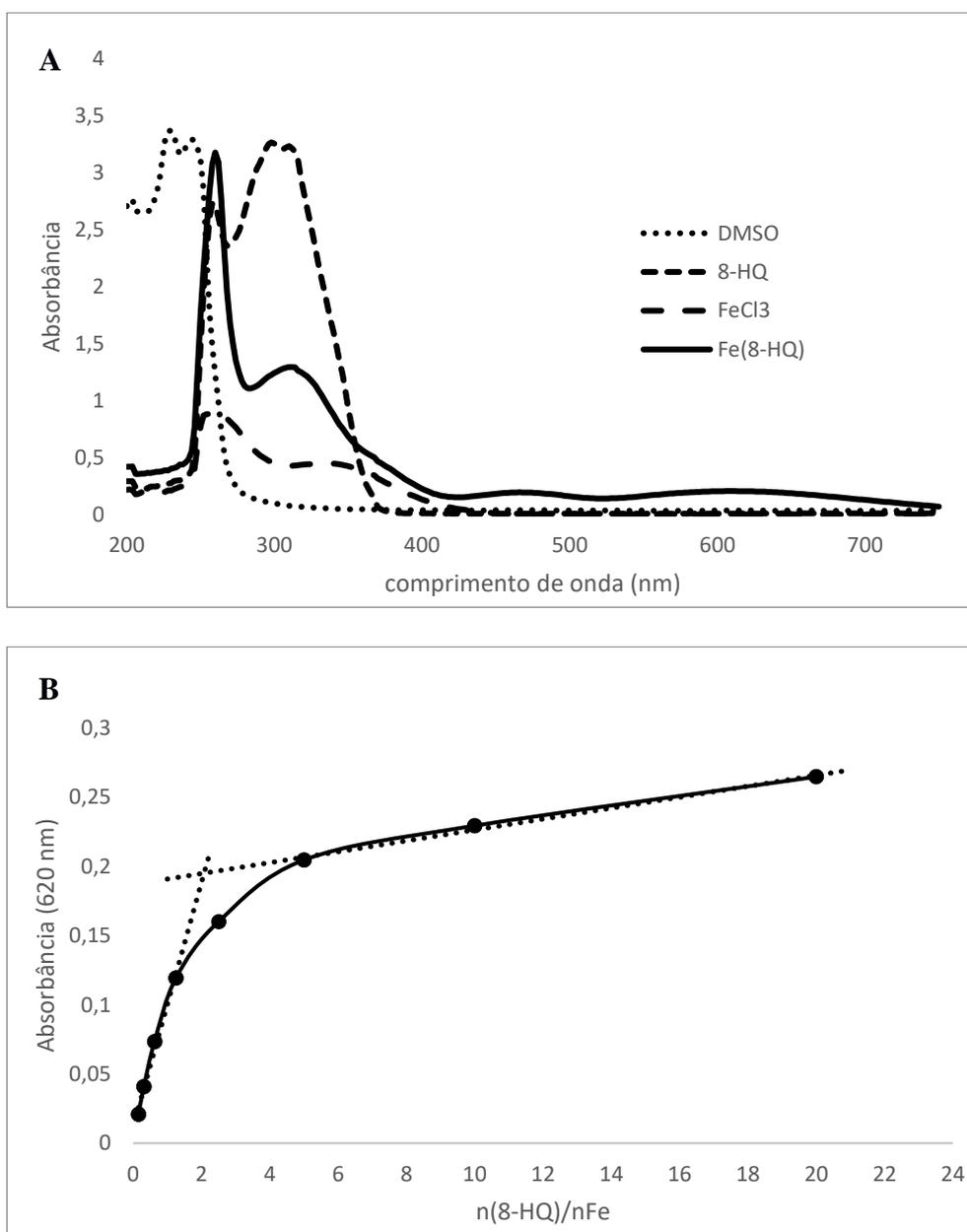


Figura 10 **A** Espectros de absorção UV-Vis de 8-HQ (8 mmol L^{-1}), cloreto férrico ($0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$), Fe(8-HQ) (5 mmol L^{-1}) em DMSO. **B** Titulação fotométrica de FeCl₃ com 8-HQ.

A 8-Hidroxiquinolina pode complexar ferro(III) em relação 1:1, 2:1 e 3:1 (Liu & Millero, 2002b), dependendo do pH do meio e das concentrações de ligante. Conforme a **figura 10B** fica evidenciada a relação estequiométrica Fe:8-HQ = 1:2. Entre 420 – 500 nm observa-se uma banda de absorção (**Figura 10A**), relacionada a transições orbital p_x (HOMO) do oxigênio fenolato ao centro metálico. A banda de menor energia ($\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$), entre 500 e 750 nm é observada para uma transição de transferência de carga do orbital p_x (no plano) a um orbital semipreenchido d_{π}^* do ferro (Hasan *et al.*, 2008).

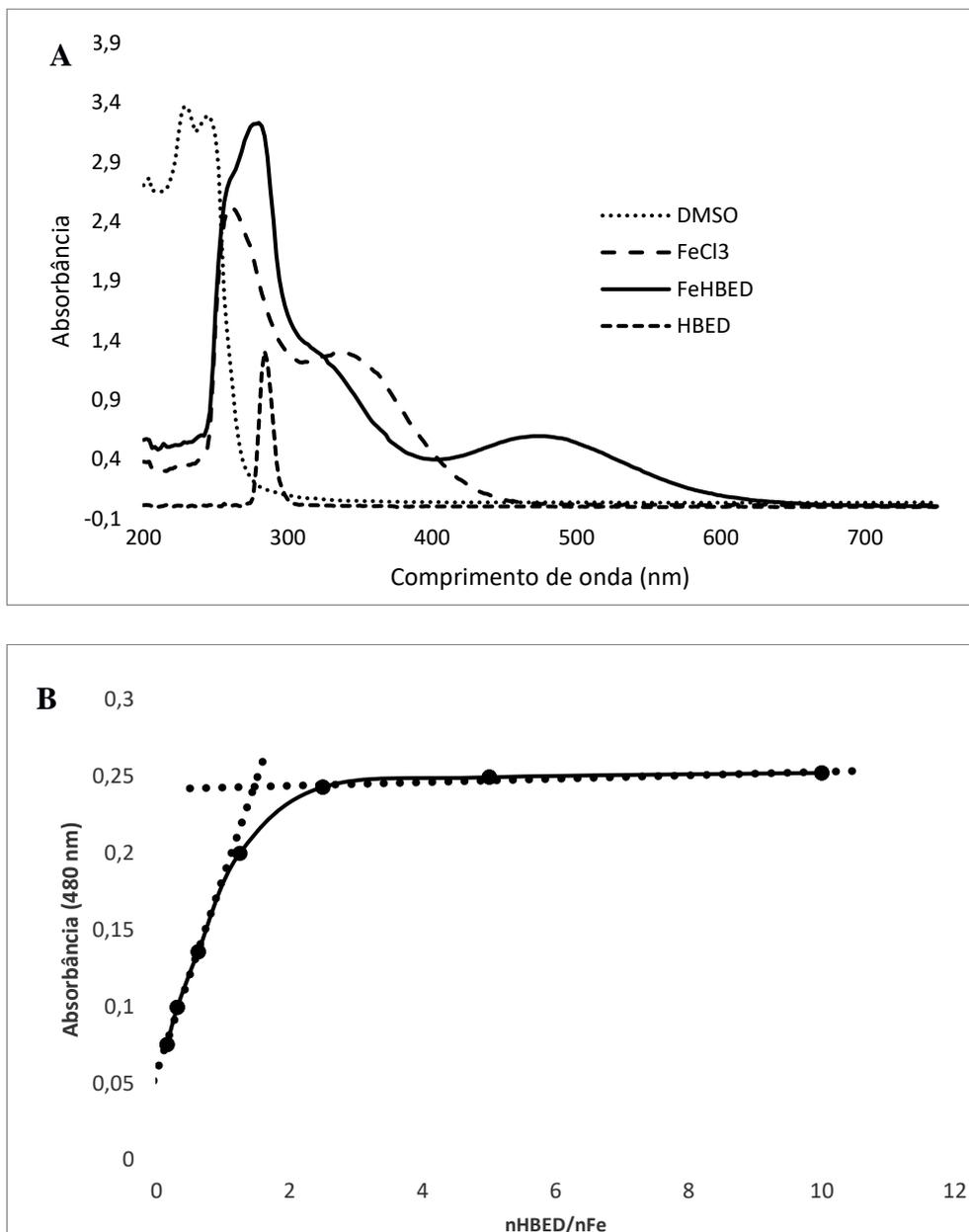


Figura 11 **A** Espectros de absorção UV-Vis do HBED ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), cloreto férrico ($0,4 \text{ mmol L}^{-1}$), FeHBED ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO. **B** Titulação fotométrica de FeCl₃ com HBED

O espectro de absorção (200 - 750 nm para o quelante, solvente e complexo) e a determinação da relação molar para o complexo FeHBED (Fe:HBED = 1:1) observa-se na **figura 11A-B**.

O quelante hexadentado HBED complexa íons tripositivos de metais como íon férrico, formando ligações com grupos fenolato, o grupo amino terciário e OH⁻ do grupo carboxilato que contêm átomos duros de oxigênio doadores de elétrons conferindo alta estabilidade termodinâmica ($\log K = 40$; $p[\text{Fe}] = 30$ (Motekaitis, Martell & Welch, 1990)). De acordo com a **figura 11A**, observa-se a formação de uma banda entre 430 e

630 nm, ($\lambda_{\text{max}} = 480$ nm em DMSO) confirmando a ligação Fe-HBED. Eplattenier *et al* (*et al.* 1967), mostrou relação estequiométrica 1:1 para $\lambda_{\text{max}} = 485$ nm ($\epsilon = 3935$), e argumentaram que alta estabilidade do complexo é conferida pela disposição estérica favorável dos átomos doadores. Bannochie & Martell (1989).*et al.* atribuem esta banda à transição de transferência ligante metal (L→M) provavelmente pela ligação ferro-fenolato

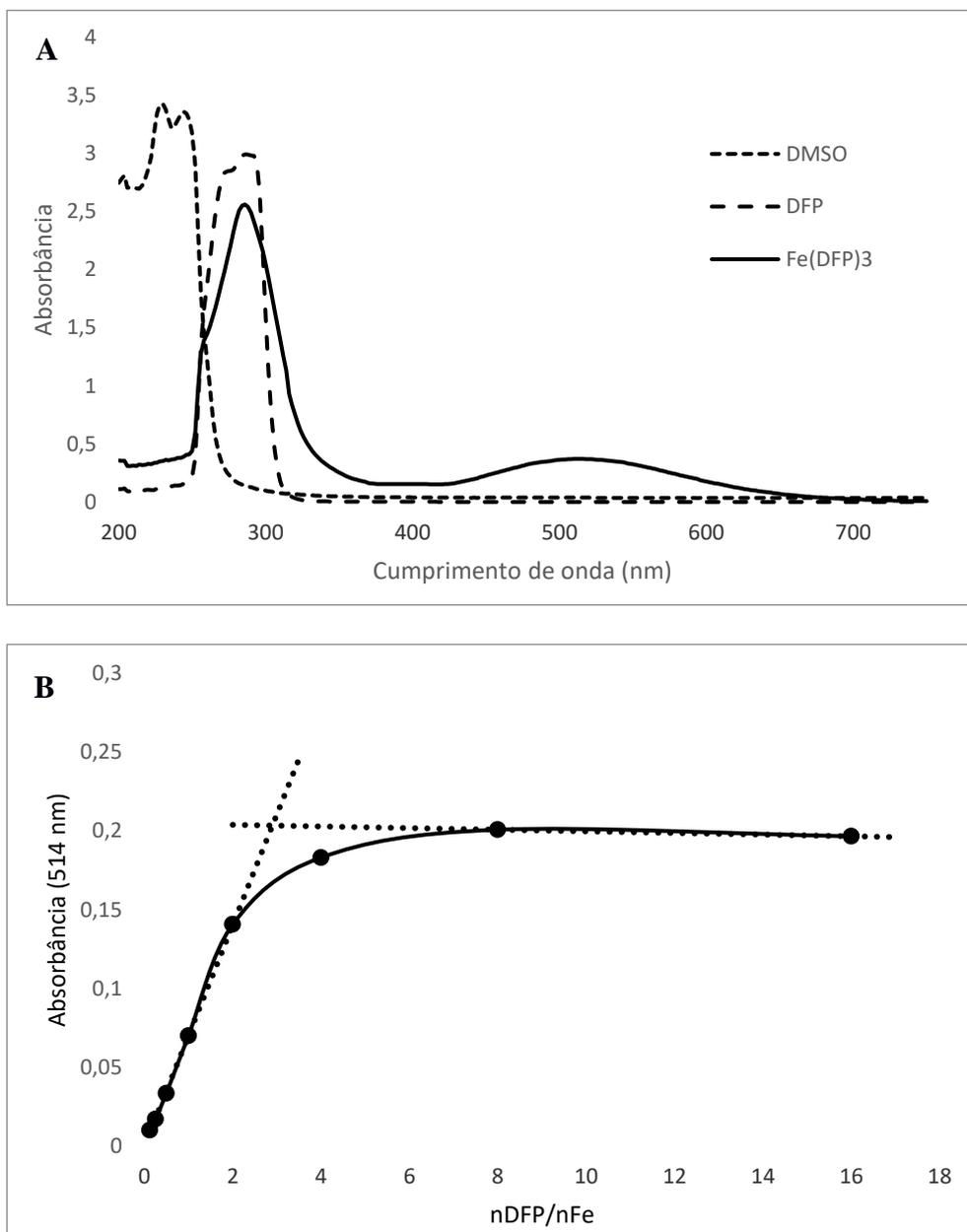


Figura 12 **A** Espectros de absorção UV-Vis do deferiprona ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{Fe}(\text{DFP})_3$ ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com DFP.

A deferiprona, ligante pertencente à família da 3-hidroxipiridin-4-onas, combina características de grupos hidroxamato e catecolato, atuando como ligante bidentado que forma um complexo octaédrico com o íon férrico ($3d^5$ – alto spin) através dos oxigênios vicinais (α – cetohidroxi). A partir do espectro eletrônico para o ligante deferiprona e o complexo $\text{Fe}(\text{DFP})_3$ (**Figura 12A**) e os dados da **Tabela 2**, demonstra-se que após a adição do $\text{Fe}(\text{III})$ à solução de DFP em DMSO forma-se uma banda característica ao redor de 514 nm banda correspondente a uma transferência de carga ligante (π) - metal (d) (Karpishin, Gebhard, Solomon & Raymond, 1991; Šebestík, Šafařík & Bour, 2012).

Estudos feitos por Nurchi *et al.* (2014) a diferentes valores diferentes de pH amostram bandas de absorção entre 400 e 800 nm com uma determinação da relação molar entre ferro e DFP é 1:3 (**Figura 12B**)

A molécula DFX é pertence à família de compostos orgânicos derivados do ácido bis-hidroxifenil-triazol benzoico que atua como ligante tridentado enlaçando ao íon férrico mediante os grupos fenolatos e o nitrogênio do anel heterocíclico. O complexo $[\text{Fe}(\text{DFX})_2]^{3-}$ com um valor de $p[\text{Fe}] = 22,5$, apresenta uma carga líquida de -3 (Steinhauser *et al.*, 2004).

A partir do espectro eletrônico para o ligante deferasirox e o complexo $[\text{Fe}(\text{DFX})_2]^{3-}$ (**Figura 13A**) e os dados da **Tabela 2**, demonstra-se que após a adição do $\text{Fe}(\text{III})$ à solução de DFX em DMSO observa-se uma banda característica ao redor de 510 nm, resultado em concordância com a literatura a determinação da relação molar entre ferro e DFX é 1:2 (**Figura 13B**) (Heinz *et al.*, 1999).

Os espectros de absorções associados ao DFO e complexo FeDFO foram obtidos para comprovar a formação do complexo, evidenciado pela formação da banda ao redor 340 – 550 nm, e a determinação da relação estequiométrica entre ferro e DFO mostra-se na **figura 14A – B**. O complexo formado entre deferoxamina e ferro (FeDFO), um composto altamente solúvel em água, apresenta uma coloração laranja em solução diluída (**Figura 5G**) e em solução concentrada uma tonalidade vermelha escura, com λ_{max} de absorção na região visível em torno aos 430 nm (**Figura 14A**), atribuída a uma transição eletrônica permitida pelo spin, desde de orbitais não ligantes do ligante a orbitais do $\text{Fe}(\text{III})$ (Monzyk & Crumbliss, 1982), com uma relação Fe:DFO de 1:1 (**Figura 14B**).

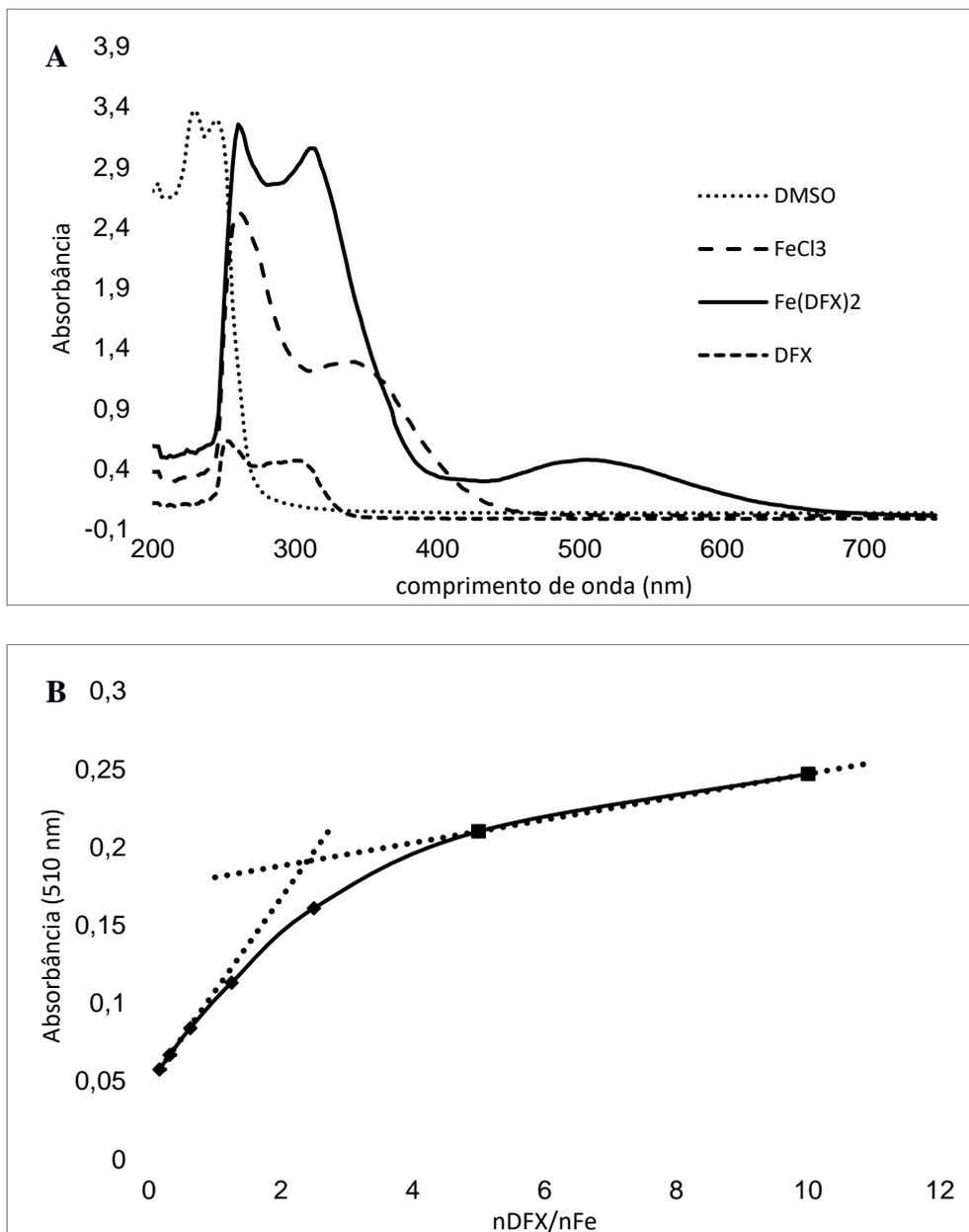


Figura 13 **A** Espectros de absorção UV-Vis, deferasirox ($0,32 \text{ mmol L}^{-1}$), cloreto férrico ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) Fe(DFX)_2 ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMSO **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com DFX.

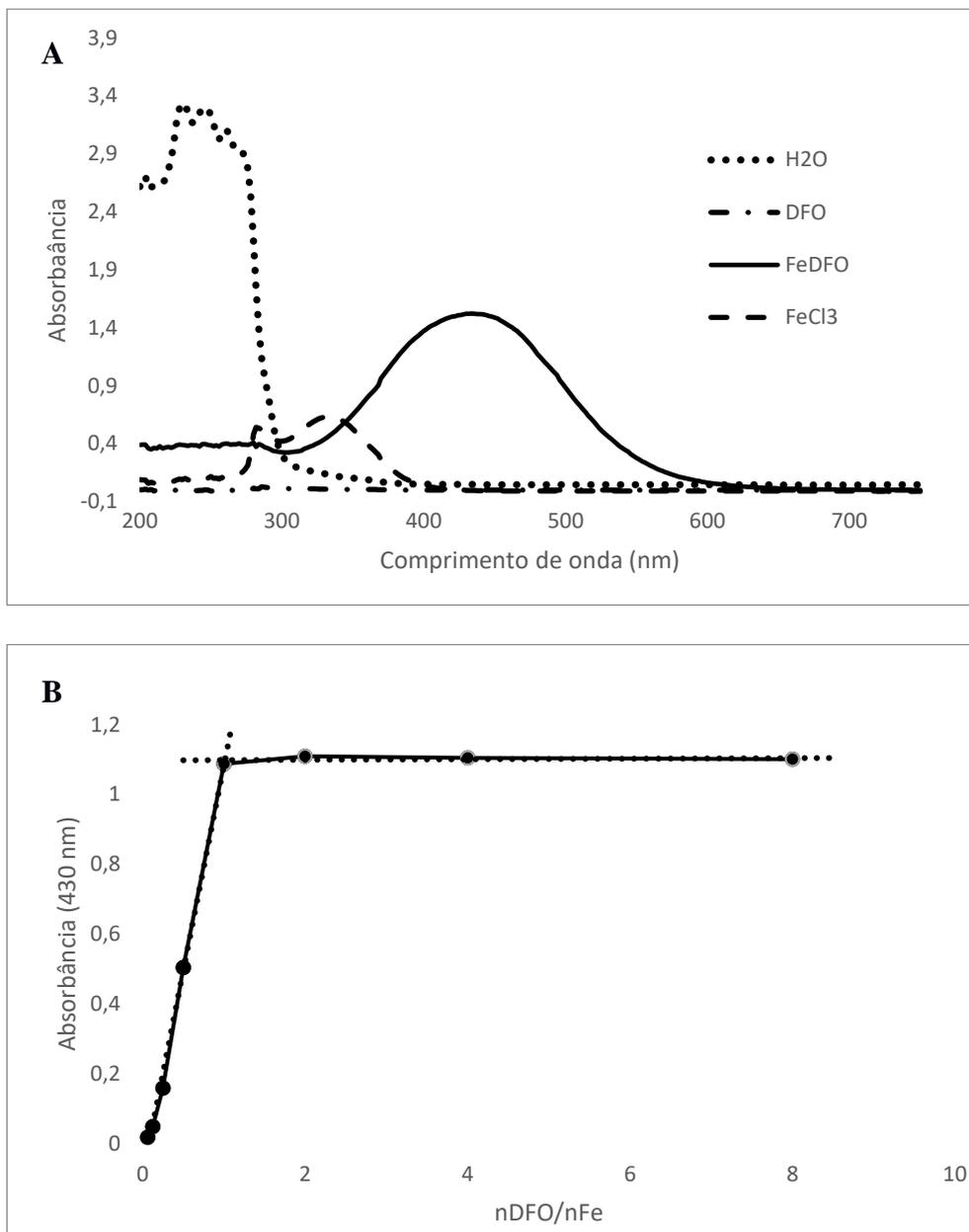


Figura 14 **A** Espectros de absorção UV-Vis, deferoxamina ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$), cloreto férrico ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e FeDFO ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em água ($\text{pH} = 5,5$) **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com DFO (1:1)

A **figura 15A – B** mostra os espectros de absorção entre 200 e 750 nm para EDTA e FeEDTA em água ($\text{pH} = 5,5$) e a determinação da relação molar entre ferro(III) e EDTA (1:1) respectivamente. Fica evidenciado na **figura 15A** que o complexo FeEDTA não tem absorbância na faixa do visível, mas uma banda na região do ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 284 \text{ nm}$ - valor próximo ao da literatura). EDTA é uma molécula hexadentada pertencente à família dos ligantes aminocarboxilatos que forma um complexo estável com Fe(III), cuja estrutura, determinada a partir do estado sólido e mantida em solução aquosa, é pentagonal bipiramidal com uma molécula de água ocupando a sétima coor-

denaço com fórmula $[\text{Fe}(\text{EDTA})\text{H}_2\text{O}]^-$ (Hoard, Lind & Silverton, 1961). O complexo FeEDTA tem sido estudado por diversos métodos espectroscópicos, os quais demonstraram que é um complexo com relação metal:ligante 1:1. Bull *et al.* (1969) encontraram $\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$ para o complexo $\text{Fe}^{+3} - \text{EDTA} - \text{OH}_2$ (pH = 5,3)..

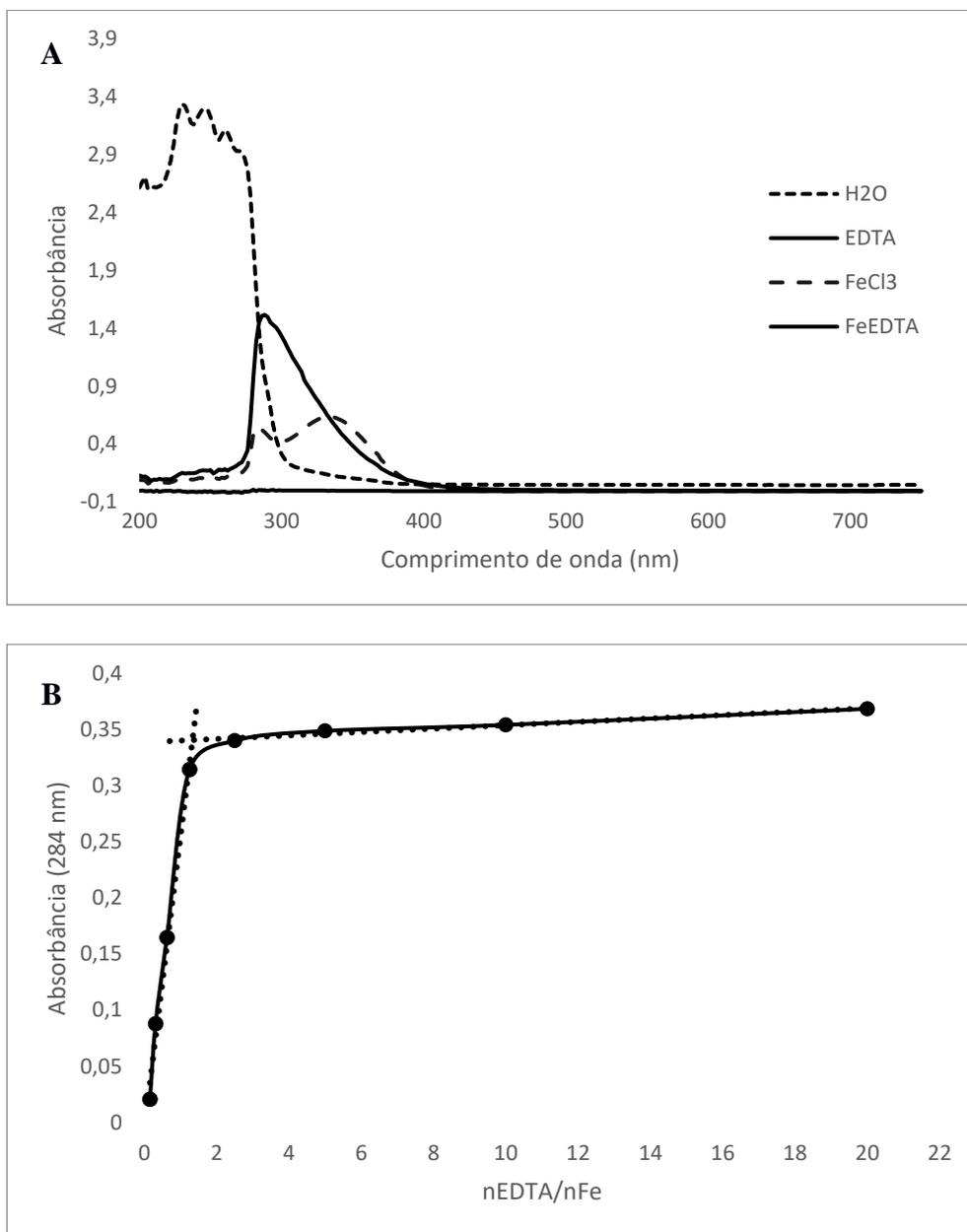


Figura 15 **A** Espectros de absorção UV-Vis do EDTA ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$), cloreto férrico ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e FeEDTA ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em água (pH = 5,5) **B** Titulação fotométrica de FeCl_3 com EDTA.

4.2 Determinação do coeficiente de partição ($\log P_{o/w}$) em complexos de ferro(III)

Procedendo-se conforme descrito no **item 3.9**, foram determinados os coeficientes de partição ($\log P_{o/w}$) para os complexos de ferro(III). Os dados foram obtidos em duplicata, pelo método “shake-flask” usando n-octanol como fase orgânica, e como fase aquosa água deionizada (pH = 5,5) a 23 °C. Os valores de $\log P_{o/w}$ obtidos para cada complexo estão mostrados na **Tabela 3**.

Previamente determinou-se os comprimentos de onda máximos (λ_{max}), coeficiente de absorvidade (ϵ) e a faixa de concentrações dos complexos de ferro(III) que obedecem a lei de Lambert-Beer. De acordo aos resultados da **Tabela 3** aprecia-se que os complexos possuem diferentes $\log P_{o/w}$, para a distribuição nas fases orgânica e aquosa, assim os mais lipofílicos são $Fe(DFX)_3$ e $Fe(8-HQ)$, no entanto, $FeHBED$, $Fe(DFP)_3$ e $FeDFO$ apresentam características hidrofílicas. Diversos estudos mostram diferentes resultados na determinação de $P_{o/w}$ em diferentes fases aquosas para ligantes livres ou formando complexos com ferro(III). Vlachodimitropoulou *et al.* (2015) mostraram tendências de lipofilicidade similares a de nossos resultados para os complexos $[Fe(DFX)_2]^{3-}$, argumentando que alta lipofilicidade do $Fe(DFX)_2$ é atribuída à alta carga negativa do complexo e aos anéis aromáticos no quelante o que fomenta a passagem do complexo através de membranas biológicas igualmente para o caso do complexo $Fe(8-HQ)$, característica que permite a distribuição do complexo intracelularmente (Jonas & Riley, 1991; Prachayasittikul, Prachayasittikul, Ruchirawat & Prachayasittikul, 2013). Estudos *et al.* mostram que $FeDFO$ e $Fe(DFP)_3$ são principalmente hidrofílicos (Porter *et al.*, 1988; Xie *et al.*, 2016) e de acordo à *European Chemicals Agency* (ECHA), o $FeHBED$, apresenta características mas hidrofílicas. Essas características hidrofílicas dos complexos conferem uma permeabilidade celular deficiente para as células.

Tabela 3. Valores de $\log P_{o/w}$ para os complexos de ferro(III)

Complexo	$\log P_{o/w}$
$Fe(DFX)_2$	$1,060 \pm 0,047$
$Fe(8-HQ)$	$0,669 \pm 0,013$
$FeHBED$	$0,608 \pm 0,013$
$Fe(DFP)_3$	$0,536 \pm 0,016$
$FeDFO$	$0,339 \pm 0,042$
$FeEDTA$	$0,170 \pm 0,021$

4.3 Monitoramento da variação da população e determinação da velocidade de crescimento das espécies da família Symbiodiniaceae frente aos complexos do ferro(III)

A variação da concentração de células celular e as velocidades de crescimento, foram avaliadas durante 21 dias, expostos aos diferentes tratamentos (complexos de ferro e quelantes livres) para cinco espécies diferentes, *Symbiodinium microadriaticum*, *Breviolum minutum*, *Cladocopium goreau*, *Effrenium voratum* e *Fugacium kawagutii*, estão representadas nas **Figuras 16 -21**.

As curvas de crescimento seguem a tendência típica de cultivo estaque mostrando a fase de adaptação (etapa prévia ao início da fase exponencial), fase exponencial (etapa onde a divisão celular procede de forma constante) e em alguns tratamentos uma fase estacionária (divisão celular mais lenta, relacionada à diminuição da disponibilidade de nutrientes), cujos resultados mostram variação entre espécies e entre grupos de tratamento. Os períodos de adaptação das condições de experimentação frente aos tratamentos foram variáveis. Nos tratamentos para *Cladocopium goreau* e *Fugacium kawagutii* houve uma queda na população com uma adaptação ao redor de 24 horas de duração (**Figuras 18A e 20A**). *Breviolum minutum* apresentou uma fase de adaptação mais longa no tratamento com FeHBED (**Figura 17A**). Resultados similares do período de adaptação em torno de 24 horas foram obtidos para *Symbiodinium microadriaticum*, embora para o tratamento com Fe(II), a fase exponencial inicia após o dia 1 (**Figura 16A**). *Effrenium voratum* não teve queda na população e com crescimento contínuo para o controle e o tratamento com o complexo Fe(DFX)₂, enquanto que, para os outros tratamentos, a fase de adaptação durou um dia (**Figura 19A**). As **Figuras 16** até **20** mostram as diferenças nos efeitos dos complexos de ferro e controles para as espécies submetidas ao estudo. Em geral, as concentrações celulares são variáveis transcorridos vinte e um dias de exposição aos tratamentos, assim a biomassa final em *Breviolum minutum* e *Effrenium voratum* foi maior (**Figuras 17 e 19 respectivamente**), *Cladocopium goreau* e *Fugacium kawagutii* responderam moderadamente (**Figuras 18 e 20 respectivamente**) ficando evidente que o desenvolvimento da população de *Cladocopium goreau* foi mais lento (**Figura 18A**) o que sugere que esta espécie não consegue ter acesso a ferro de fontes complexadas.

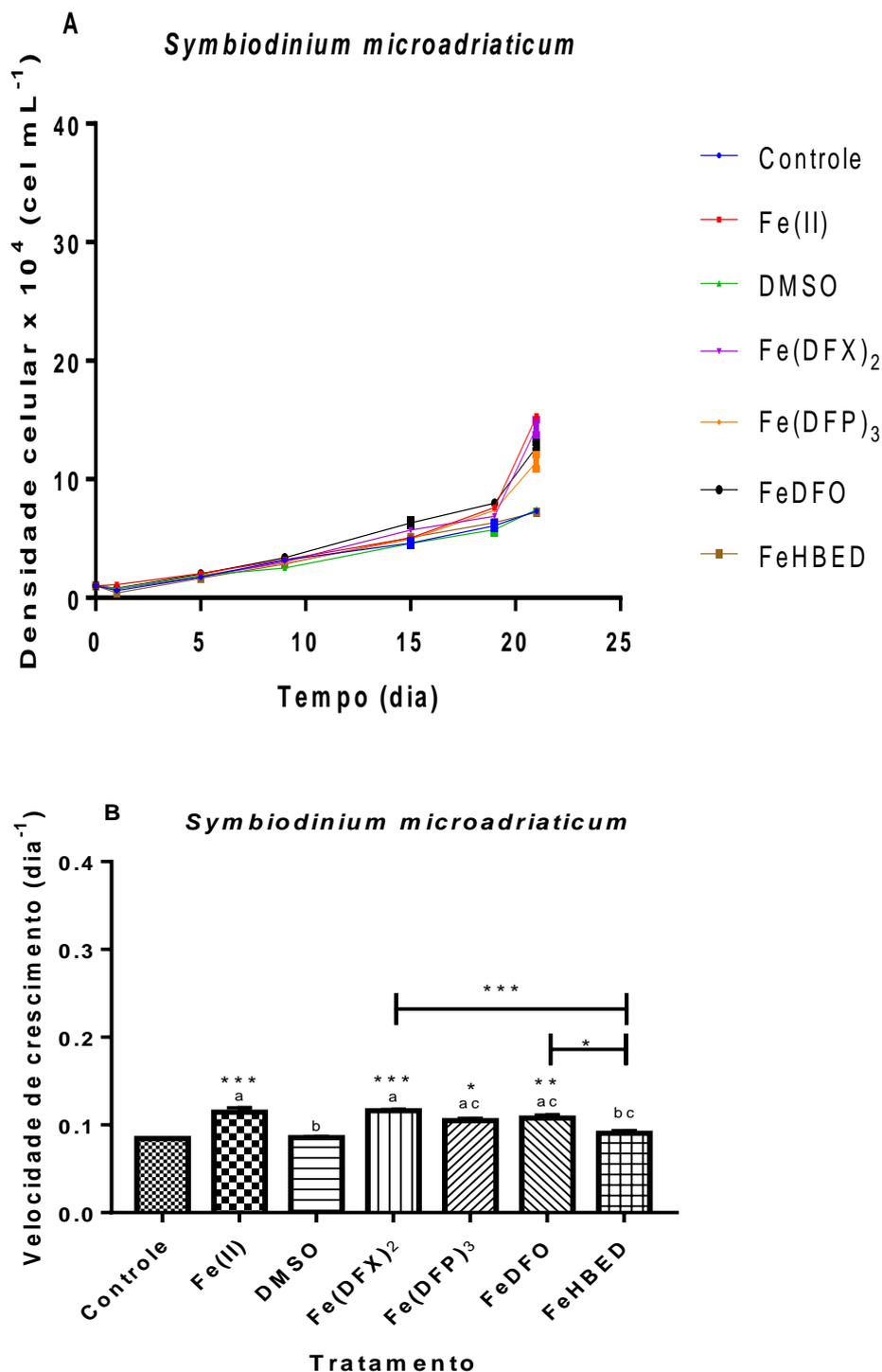


Figura 16 **A** Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) em *Symbiodinium microadriaticum* em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard - F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Ao redor dos cinco primeiros dias a microalga inicia o período de aclimação. **B** Taxas de crescimento (μ) do *Symbiodinium microadriaticum* exposto aos complexos de ferro(III) determinados na fase exponencial de crescimento. Os valores representam a média \pm SD (n = 3) para um nível de significância de ***p < 0,001, ** < 0,01, * < 0,05. As barras com letras iguais não são significativamente diferentes p > 0,05

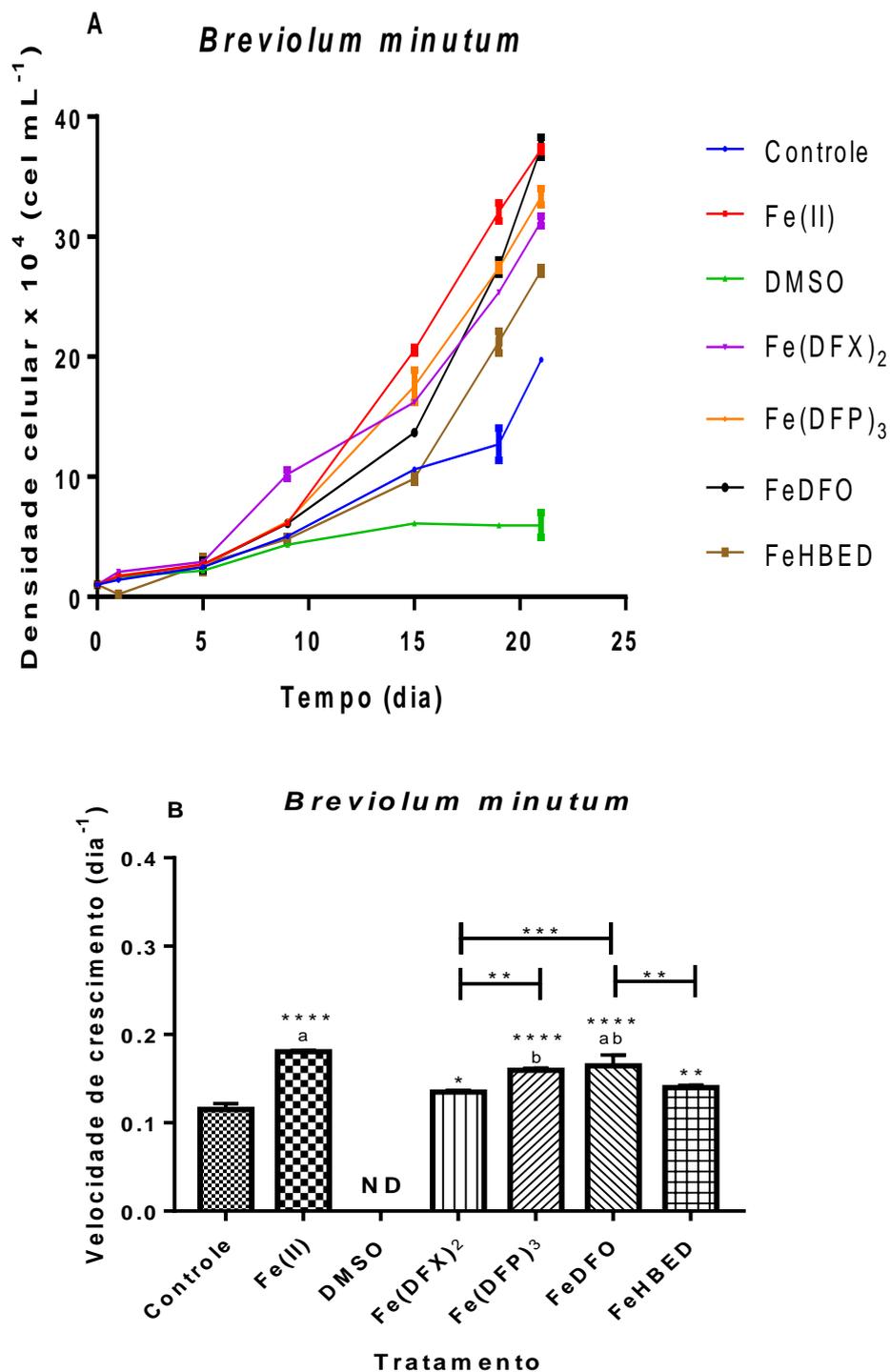


Figura 17 **A** Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) no *Breviolum minutum*, em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard-F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Ao redor dos cinco primeiros dias a microalga inicia o período de aclimação. **B** Taxas de crescimento (μ) do *Breviolum minutum* exposto aos complexos de ferro(III) determinadas na fase exponencial de crescimento. Os valores representam a média \pm SD (n = 3) com diferenças estatísticas (**** p < 0,0001, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05). As barras com letras iguais não são significativamente diferentes (p > 0,05), ND = não detectado.

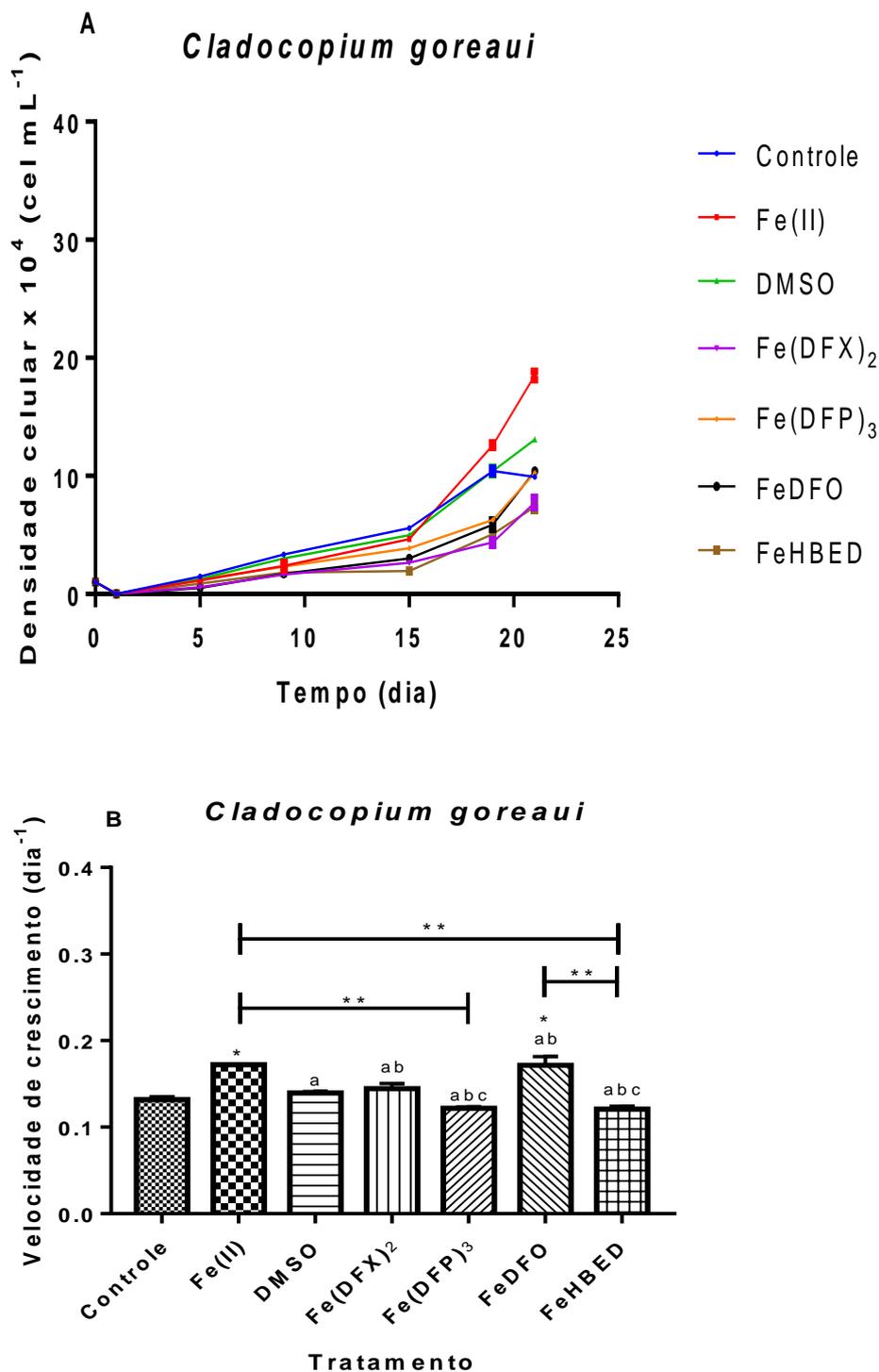


Figura 18 **A** Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) no *Cladocopium goreau*, em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard-F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Ao redor dos cinco primeiros dias a microalga inicia o período de aclimação lenta. **B** Taxas de crescimento (μ) do *Cladocopium goreau* exposto aos complexos de ferro(III). Os valores representam a média \pm SD (n = 3), como diferenças estatísticas (**p < 0,01, ***p < ,0001) As barras com letras iguais não são significativamente diferentes (p >0,05)

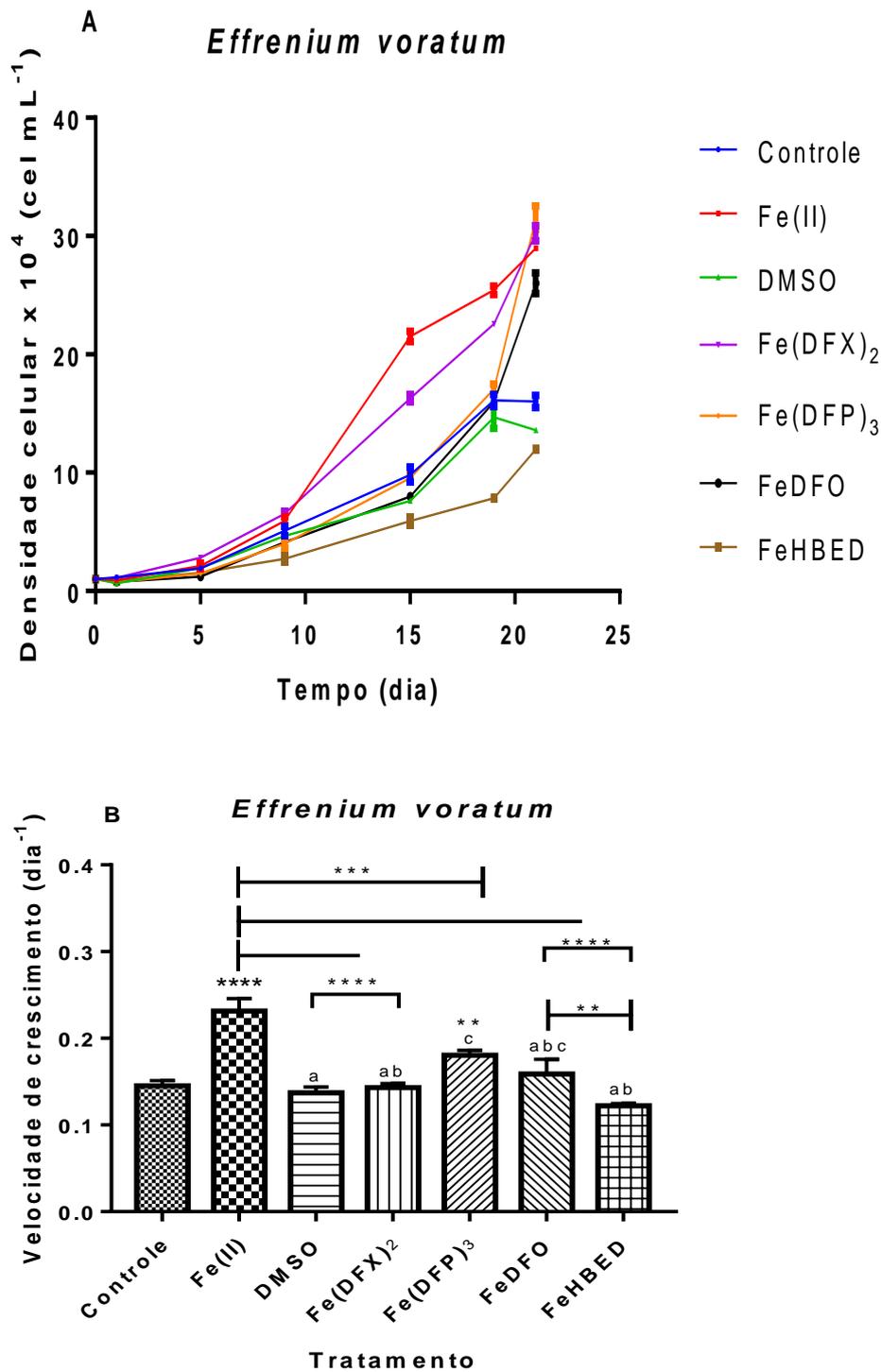


Figura 19 **A** Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) na espécie *Effrenium voratum*, em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard- F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = $11,7 \mu\text{mol L}^{-1}$). **B** Taxas de crescimento (μ) do *Effrenium voratum* exposto aos complexos de ferro(III) determinadas na fase exponencial de crescimento. Os valores representam a média \pm SD ($n = 3$) com diferenças estatísticas (** $p < ,001$; **** $p < ,0001$). As barras com letras iguais não são significativamente diferentes ($p > 0,05$)

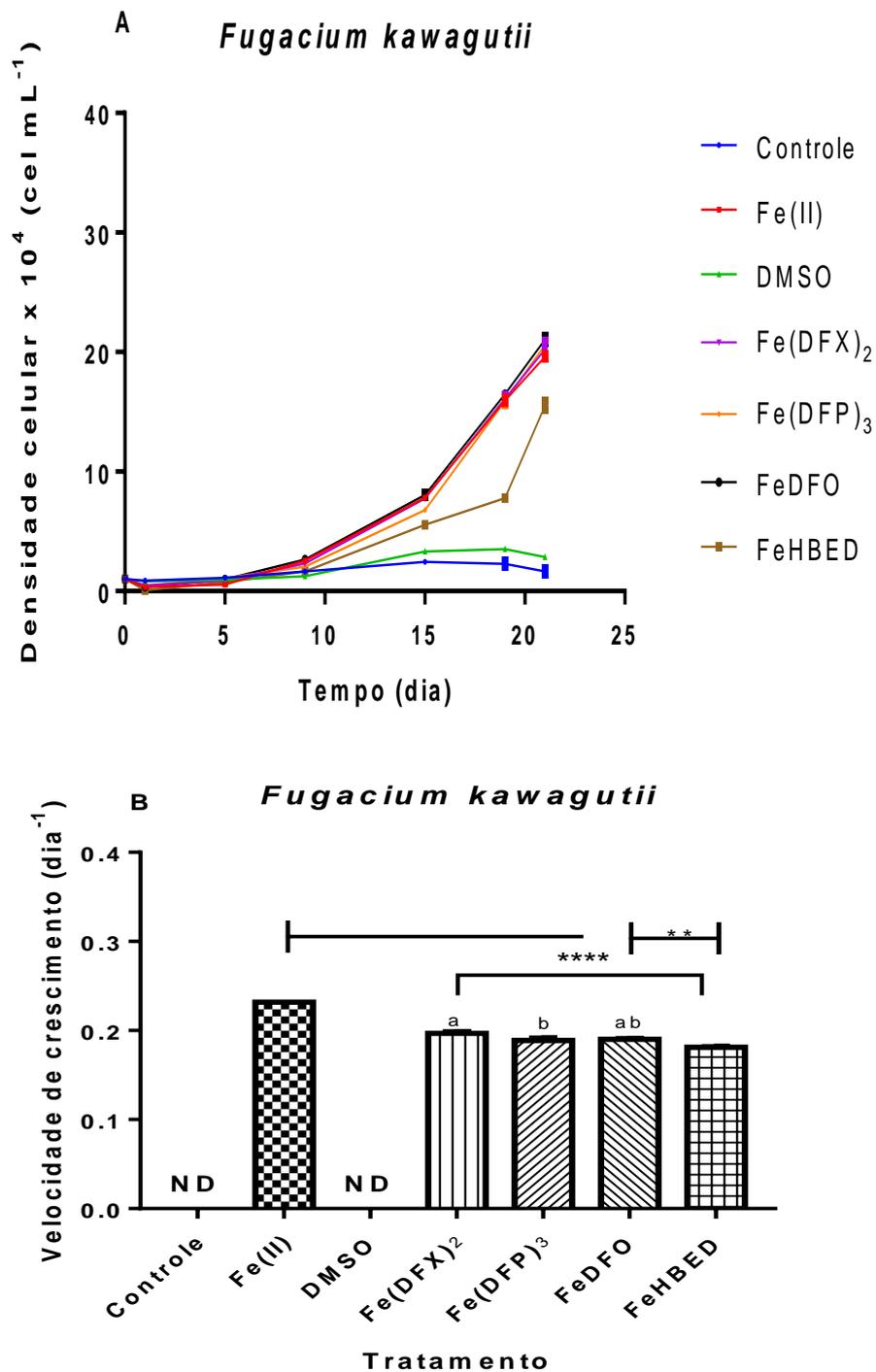


Figura 20 **A** Comparação das mudanças na população no curso do tempo (0 – 21 dias) no *Fugacium kawagutii*, em água do mar suplementada com meio de cultura Guillard-F/2 isento de ferro com adição dos complexos de ferro (concentração final = 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Durante os cinco primeiros dias a microalga inicia o período de aclimação lenta. **B** Taxas de crescimento (μ) do *Fugacium kawagutii* exposto aos complexos de ferro(III) determinadas na fase exponencial de crescimento. Os valores representam a média \pm SD (n = 3) com diferenças estatísticas de (****p < 0,0001; * < 0,05) As barras com letras iguais não são significativamente diferentes (p > 0,05) ND = não detectado.

Por outro lado, os perfis de crescimento dos tratamentos em *Symbiodinium microadriaticum* são similares entre si e mais baixos em comparação às outras espécies, isto é refletido nos valores de população celular e baixos valores de taxas de crescimento (**Figura 16B**) cujos valores variaram entre 0,08 e 0,12 dia⁻¹, no entanto o crescimento foi contínuo até o dia 21 (**Figura 16A**). Esses resultados obtidos em *Symbiodinium microadriaticum*, demonstram que não há diferenças entre a forma de ferro suplementado. Outra particularidade foi a constatação de que, para todas as espécies, se observou um efeito contínuo no crescimento frente à exposição aos complexos de ferro, pois ao terminar o experimento ainda não se havia atingido a fase exponencial.

Em relação ao controle (sem adição de ferro) os cultivos de *Cladocodium goreau*, *Effrenium voratum* e *Fugacium kawagutii* atingiram estados estacionários embora com baixas populações antes que *Symbiodinium microadriaticum* e *Breviolum minutum* (**Figuras 16A até 20A**), no entanto não foi possível distinguir uma fase exponencial clara em *Fugacium kawagutii* o que impediu determinar a velocidade de crescimento, além de ter sido a espécie mais sensível frente à carência de ferro nos cultivos (**Figura 20A**). Adicionalmente, em termos de densidade populacional, ao redor do dia 21 da exposição, o controle teve um crescimento menor em comparação a outros tratamentos, exceto para duas espécies, em *Cladocodium goreau*, cujo valor foi maior em comparação aos complexos de ferro(III), e para *Effrenium voratum* frente à exposição do complexo de mais alta estabilidade FeHBED (p[Fe] = 31) (Zhou, Ma, Kong & Hider, 2012). Em conclusão, os complexos de ferro(III) aplicados nos cultivos de *Cladocodium goreau* não aportam ou sustentam de forma eficaz o crescimento. Esses resultados refletem estratégias diferentes de captação e armazenamento de ferro em *Cladocodium goreau* em comparação às outras espécies estudadas.

Por outra parte, a adição do DMSO (usado como um segundo controle, pois foi o solvente para sintetizar os complexos de ferro(III), por tanto teve-se que verificar seus efeitos no crescimento dos dinoflagelados) até uma concentração final de 0,12% v v⁻¹ nos cultivos mostrou resultados variáveis. Em *Symbiodinium microadriaticum* observou-se crescimento exponencial de forma contínua até o dia 21, no entanto em *Breviolum minutum* e *Fugacium kawagutii* a fase estacionária adiantou-se ao redor do dia 15 (**Figuras 17A e 20A**) e até o dia 19 para *Cladocodium goreau* e *Effrenium voratum* (**Figura 19A**). Cabe ressaltar que a determinação da velocidade de crescimento para as espécies *Breviolum minutum* e *Fugacium kawagutii* expostos a DMSO não foi determinada devido às baixas populações atingidas e sem uma fase exponencial clara (**Figuras 17A e 20A**). *Breviolum minutum* foi mais afetado pela exposição ao DMSO em compa-

ração aos outros tratamentos, sugerindo assim que DMSO exerce efeitos negativos para esta espécie ainda que em baixos níveis. Tampouco se descarta a ideia de que os complexos, DMSO sozinho ou em combinação podem resultar tóxicos para esta espécie. Embora DMSO seja um solvente aprótico apolar, é um componente sulfurado dos ambientes marinhos, foi detectado em corais formados pelo simbiote como defesa antioxidante e produto de degradação de moléculas sulfuradas frente ao estresse térmico (Jones & King, 2015). Devido a que é amplamente usado em bioensaios, foi demonstrado que é pouco tóxico em microalgas e não provoca danos na membrana (Jay, 1996; Okumura, Koyama, Takaku & Satoh, 2001). Pode-se concluir que na exposição ao DMSO, o progresso ou retardamento da divisão celular deve-se na verdade à baixa concentração de ferro.

Em relação aos perfis de crescimento nas espécies expostas aos tratamentos com Fe(II) (ferro livre), com exceção de *Symbiodinium microadriaticum*, ao redor do dia 21 tanto as densidades celulares máximas como a velocidade de crescimento foram altas para todas espécies com respeito a outros tratamentos. É sabido que o meio Guillard-F/2 contém o carregador EDTA que garante os metais traço em solução, assim possivelmente o transporte de ferro seja mediante este quelante. Para tratamentos com suplementação de ferro livre ou quelado, os valores da velocidade de crescimento e populações celulares atingidas até o dia 21 em *Breviolum minutum*, *Effrenium voratum* e *Fugacium kawagutii*. foi de maneira contínua e com altas populações (**Figuras 17, 19, e 20 respectivamente**) Como se observa na **Figuras 17B, 19B e 20B**, para os tratamentos com suplementação de ferro, as velocidades de crescimento evidenciam um efeito positivo na população, especialmente nos tratamentos com Fe(II), Fe(DFP)₃ e FeDFO foram diferentes estatisticamente significativos com respeito ao controle. Assim o crescimento não afetado nessas espécies sugere que podem aceder a fontes de ferro tanto fortemente complexadas como ferro livre. Esses dados podem sugerir uma estratégia diferente de assimilação e necessidade similar entre espécies com requerimentos diferentes de ferro.

A absorção biológica de Fe depende muito de sua solubilidade e especiação química na água do mar. Importantes estudos *in situ* de enriquecimento de ferro nos mares abertos foram feitos a inícios da década dos 90, estabelecendo que o fornecimento de ferro estimula o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos marinhos, inclusive de microalgas tóxicas (Trick *et al.*, 2010), embora após pouco tempo transcorrido a população decaia pela diminuição de nutrientes.

Por sinal, o ferro no mar aberto se oxida rapidamente à sua forma insolúvel tendendo a depositar-se no fundo do mar, espalhando-se horizontalmente ou incorporando-se a outras partículas (Gordon, Johnson & Coale, 1998), o que obrigaria a múltipla sementeira de ferro. Nós propomos que, para ter uma liberação mais controlada de ferro, o mesmo seja administrado com diferentes agentes complexantes com características químicas e estabilidade definidas.

Para entender verdadeiramente o vínculo entre o abastecimento de ferro e a produtividade nas microalgas, primeiro precisa-se definir quimicamente a disponibilidade das espécies proporcionadas para elucidar a relação de diferentes formas químicas de ferro e sua absorção pelas microalgas. O ferro, sendo um elemento limitante nas microalgas, tem conhecidos seus mecanismos de captação, por exemplo moléculas transportadoras de alta afinidade que complexam o ferro quando as concentrações são baixas. Por outro lado, os sistemas de absorção de ferro baixa afinidade são constituídos de proteínas transportadores na membrana, p. ex. a ferro permease, e reguladores férricos (ferrirreductasas), embora esta aquisição de ferro esteja fortemente regulada, pois o excesso de ferro é sumamente tóxico para as microalgas (Blaby-Haas & Merchant, 2012, 2017).

Cabe ressaltar que a possível redução e assimilação do ferro pelas microalgas está influenciada pela estabilidade dos complexos nos ambientes marinhos. Devido a isso, a liberação do ferro pelos complexos deve ser controlada (Rose & Waite, 2003). Assim complexos propensos a processos redox ou decomposição (fotodissociação) geram ferro causando precipitação, por outro lado complexos inertes não conseguem liberar ferro facilmente para influenciar o crescimento das algas. Adicionalmente cabe ressaltar que não existe evidência alguma de que as espécies da família Symbiodiniaceae sintetizem sideróforos para assimilar ferro do ambiente (Jermy, 2009).

É demonstrado que a disponibilidade de ferro dissolvido é importante nos microrganismos marinhos como fator limitante para o crescimento (Falkowski, Barber & Smetacek, 1998; D. A. Hutchins & Boyd, 2016; Morel & Price, 2003; Sunda *et al.*, 1991). Efeitos variados da exposição ao ferro sob as espécies da família Symbiodiniaceae e em simbiose com corais têm sido observados na literatura que dependem de sua concentração no meio em cultivos de laboratório (B. Rodriguez, Lin, Ho & Ho, 2016; Reich, Rodriguez, *et al.*, 2020), além de evidências que, a elevadas temperaturas o branqueamento em corais são reforçadas pela limitação de ferro (Shick *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015). Estudos anteriores em diferentes espécies da família Symbiodiniaceae, estabeleceram a concentração ótima de ferro para atingir altas densidade celular no

estado estacionário e manter o crescimento em cultivos de laboratório (Reich et al., 2020; Rodriguez et al., 2016).

Estudos realizados com FeEDTA, um complexo que se dissocia pela ação da luz e é considerado como uma fonte de Fe(III), demonstraram que a forma livre de Fe(III) seguida da fotorredução a Fe(II) é uma fonte importante e suficiente para sustentar a produtividade primária independente do organismo ou mecanismo envolvido de absorção (Morel, Kustka & Shaked, 2008).

Normalmente o uso de sideróforos hidrofílicos de fontes naturais (DFO) ou sintéticos (HBED), em cultivos de laboratório são aplicados para impor limitação de ferro artificialmente (M. L. Wells & Trick, 2004). Por outro lado, apesar de que a complexação ajuda no aumento da solubilidade do ferro para diminuir as perdas por precipitação, pode diminuir a disponibilidade do metal. Os complexos de ferro(III) com quelantes hexadentados como DFO e HBED são termodinamicamente e cineticamente mais estáveis em comparação com quelantes tri- (DFX) ou bidentados (DFP), pois o ferro(III) se encontra menos disponível (estereoquimicamente mais protegido por seis átomos) para as ferriredutases de membrana. Por outro lado, estudos comparativos de assimilação de ferro(III) entre microrganismos procariotos e eucariotos marinhos expostos a sideróforos naturais com grupos catecolato ou hidroxamato com alta afinidade pelo ferro, e porfirinas, demonstraram que o maior teor de ferro obtido pelos primeiros foi através de ligantes com grupos catecolatos e hidroxamatos, cuja explicação está baseada na assimilação através de receptores específicos de grupos funcionais na membrana. No entanto o sistema de captação de ferro em eucariotos baseado em ferriredutases não específicas para ligantes mobilizou ferro a partir de ligantes porfirínicos (Hutchins *et al.*, 1999). Embora os corais tenham comunidades bacterianas que adquirem ferro diretamente do mar, para as microalgas da família Symbiodiniaceae que formam simbiose a captação de ferro possivelmente é feita pelo cnidário.

A capacidade dos quelantes para liberar ferro dos complexos é maior para ligantes diferentes dos hexadentados devido à maior labilidade cinética. Cabe ressaltar, em termos do potencial redox, os quelantes aplicados na experiência mantêm o ferro(III) inativo prevenindo reações associadas ao estresse oxidativo, ou seja, o Fe(III) não consegue-se reduzir a Fe(II) mediante agentes redutores do meio (OH^- , O_2^- , ascorbato ou tioles) (Esposito, 2003; Liochev, 1999; Samuni *et al.*, 2001). Outra característica importante a destacar dos complexos e ligantes, que guardam relação com doenças associadas a sobrecarga de ferro, se relaciona com a alta lipofilicidade que confere a capacidade de atravessar membranas biológicas, e funcionar como carregadores de ferro em células.

Frente à exposição das espécies da família Symbiodiniaceae aos quelantes livres, os resultados foram diversos. Por exemplo, as espécies *Cladocopium goreau* e *Effrenium voratum* mostraram efeitos positivos no crescimento e tendências similares na velocidade de crescimento frente a todos os quelantes livres. Por outro lado, as microalgas *Symbiodinium microadriaticum* e *Fugacium kawagutii*, não atingiram uma fase exponencial clara, o que dificultou a determinação das velocidades de crescimento, resultado similar para *Breviolum minutum*, exposto a DFX, DFO e HBED (**Figura 21A**). Isto pode ter diferentes motivos, como acumulação de substâncias metabólicas excretadas, decomposição das microalgas mortas, toxicidade dos quelantes, embora nesta etapa a descrição dos processos moleculares subjacentes são pouco conhecidas e estudadas devido à falta de dados em microalgas, pela baixa população atingida nesse tempo. Estudos feitos por Gottwald *et al.*(2020) em células de rim, demonstraram que o DFX, é tóxico a pH fisiológico como quelante livre, conforme à alta lipofilicidade do quelante DFX ($\text{Log}[P] = 3,51 - 4,74$, DrugBank), pode diminuir os níveis de ferro lábil, dos diversos compartimentos celulares, i.e., mitocôndrias e possivelmente os cloroplastos seja um alvo em algas. A exposição do quelante livre DFP a *Breviolum minutum*, *Cladocopium goreau* e *Effrenium voratum* evidenciam crescimento contínuo e altas populações atingidas ao redor do dia vinte e um, embora *Effrenium voratum* adiante a fase estacionária a partir do dia dezenove (**Figura 21A**). Em primeiro lugar o quelante livre pode estar transportando baixas concentrações de ferro(III) provenientes da água de mar ou outros metais traço (Moridani & O'Brien, 2001; Pashalidis & Kontoghiorghes, 2001) que substituam funções de biológicas de ferro (Twining & Baines, 2013) e assim sustentar positivamente o crescimento. Mas esses resultados ainda não são conclusivos para explicar os efeitos positivos no crescimento em comparação com outros quelantes livres, embora nós sugerimos que as microalgas ou bacterias do meio provavelmente metabolizam a DFP como uma fonte de carbono e nitrogênio.

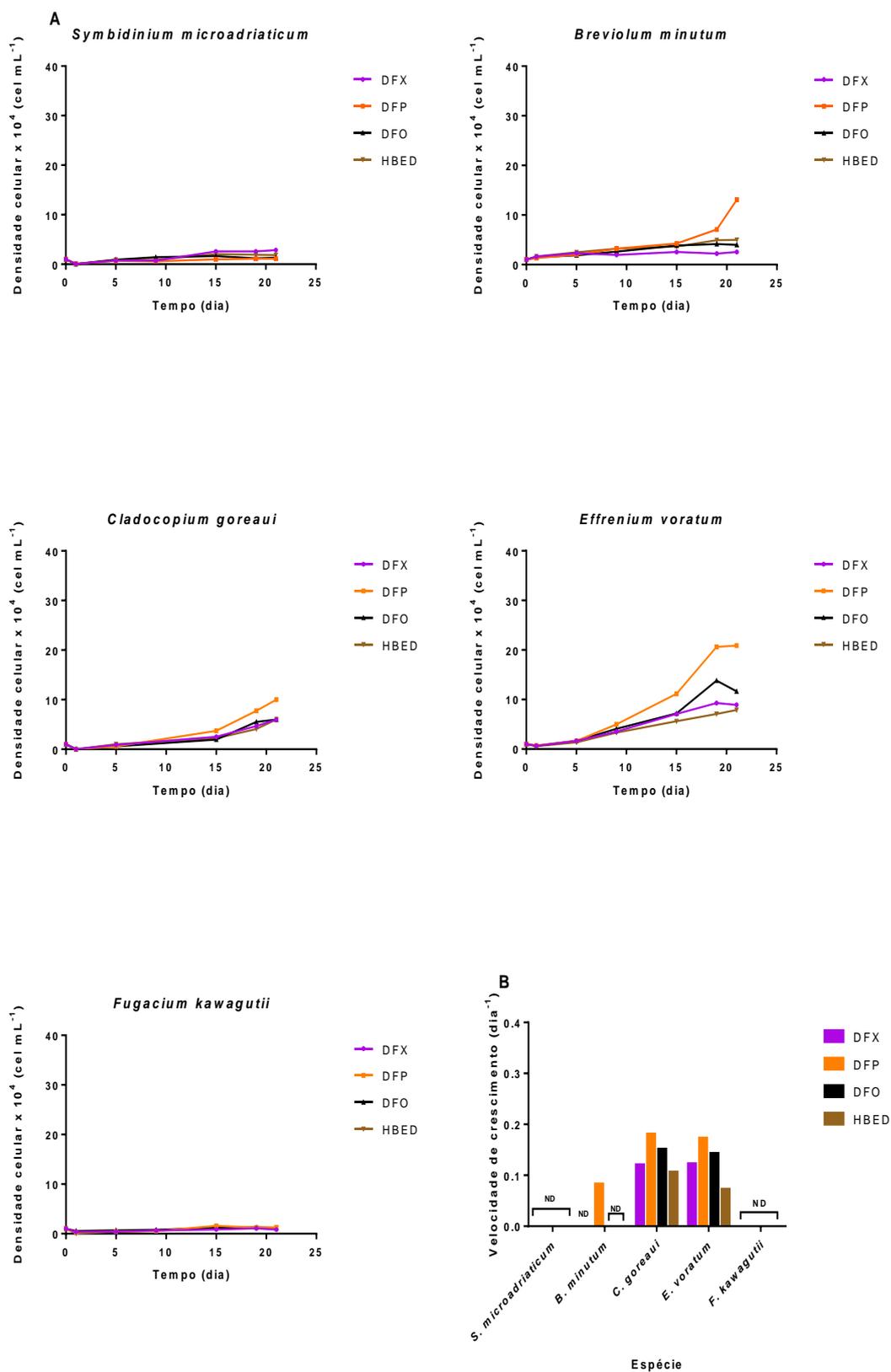


Figura 21 A Variação na população das espécies da família Symbiodiniaceae pela exposição aos quelantes livres. B Velocidade de crescimento para as diferentes microalgas cultivadas expostas aos quelantes (n = 1) ND = não detectado.

4.4 Determinação do ferro intracelular nas espécies da família Symbiodiniaceae por absorção atômica

A **Figura 22** apresenta os resultados do conteúdo de ferro intracelular total, para todas as espécies expostas aos tratamentos e quelantes livres. Em geral, quatro das espécies (*Symbiodinium microadriaticum*, *Breviolum minutum*, *Effrenium voratum* e *Fugacium kawagutii*.) mostram valores baixos de ferro total intracelular para todos os tratamentos, no entanto *Cladocopium goreau*. apresentou altos valores pela exposição a diferentes formas de ferro (livre ou quelado). De acordo com a **Figura 22**, todas as espécies da família Symbiodiniaceae sem adição de ferro mostram baixa quantidade de ferro basal por célula. Resultados similares apresenta o tratamento com DMSO que não alterou esses níveis significativamente em comparação ao controle. Esta relação direta entre a deficiência de ferro indica que as células estiveram fisiologicamente limitadas pelo ferro, considerando o papel deste micronutriente s para o desenvolvimento das células. Esses resultados concordam com prévios estudos referidos à baixa disponibilidade de ferro no ambiente marinho (Reich et al., 2020; Rodriguez et al., 2016).

Evidenciado na **Figura 22**, o teor de ferro intracelular total foi significativamente maior comparado com o controle para todas as espécies tratadas com Fe(II) (ferro livre). Em relação ao ferro total intracelular para os tratamentos com ferro quelado, mostrou altos valores com Fe(DFX)₂ em *Cladocopium goreau*, os níveis de ferro intracelular encontrados não tiveram diferenças significativas com ferro livre.

Em outros casos, o tratamento com complexos não levou aos mesmos níveis de ferro intracelular atingidos pelo tratamento com ferro livre. Foi o caso de *Symbiodinium microadriaticum* e *Breviolum minutum*, *Effrenium voratum* e *Fugacium kawagutii* tratado com Fe(DFX)₂, Fe(DFP)₃, FeDFO e FeHBED, de *Cladocopium goreau*. tratado com Fe(DFP)₃, FeDFO e FeHBED.

Interessantemente, observou-se maior teor de ferro intracelular em três das espécies (*Cladocopium goreau*, *Effrenium voratum* e *Fugacium kawagutii*) submetidas ao tratamento com Fe(DFX)₂ comparado com outros complexos. Possivelmente, pode estar relacionado com a alta lipofilicidade do complexo (Vlachodimitropoulou Koumoutsea, Garbowski, & Porter, 2015). Especificamente para *Cladocopium goreau*, o resultado sugere um mecanismo de assimilação e armazenamento do ferro diferente comparado com os tratamentos que usam complexos de alta estabilidade.

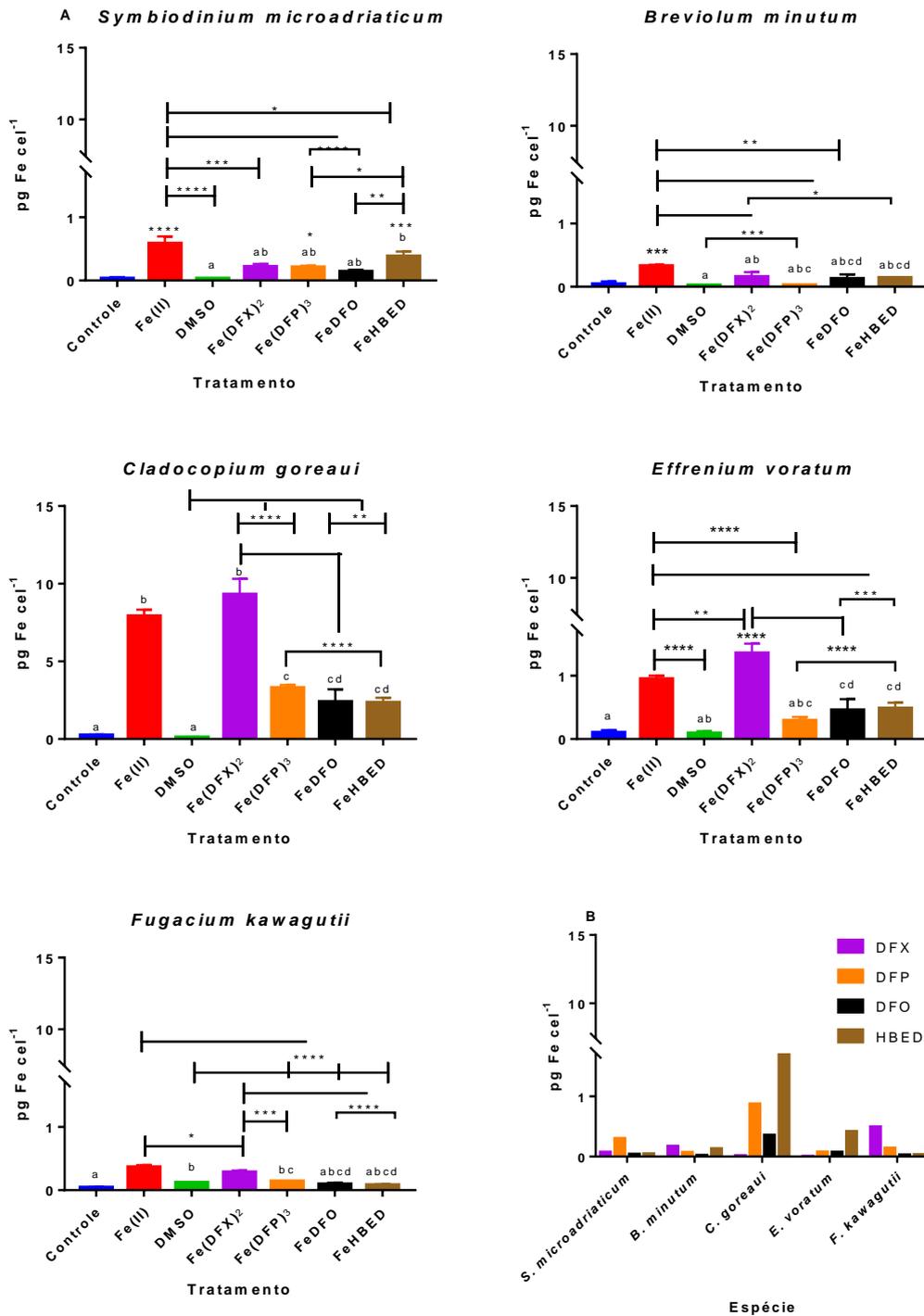


Figura 22 **A** Teor de ferro intracelular total para diferentes espécies da família Symbiodiniaceae expostos aos complexos de ferro(III) em meio Guillard – F/2 livre de ferro. A amostragem foi após 21 dias de aplicação dos complexos. Todos os tratamentos foram suplementados com $11,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe. As barras de erro representam o desvio padrão para cultivos em triplicata com diferenças estatísticas: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. As barras com letras iguais não são significativamente diferentes $p > 0,05$. **B** Teor de ferro intracelular total para diferentes espécies da família Symbiodiniaceae expostos aos quelantes em meio Guillard – F/2 livre de ferro. A amostragem foi feita após 21 dias da aplicação dos quelantes na mesma concentração dos complexos ($n = 1$).

A exposição das espécies aos quelantes livres mostrou níveis muito baixos de ferro intracelular para *Symbiodinium microadriaticum*, *Breviolum minutum*, *Effrenium voratum* e *Fugacium kawagutii*, para todos os tratamentos. No entanto, *Cladocopium goreau* mostrou maiores valores de ferro intracelular para os quelantes DFP e HBED, que possivelmente mobilizam ferro mais eficientemente para esta espécie a baixas concentrações de ferro. Além disso para todas as espécies houve baixo teor de ferro intracelular exposto ao DFO e DFX (com uma caída drástica em *Cladocopium goreau* e *Effrenium voratum*). Os quelantes DFP (*Symbiodinium microadriaticum* < *Cladocopium goreau*) e HBED (*Effrenium voratum* < *Cladocopium goreau*) tiveram resultados variáveis (**Figura 22B**), indicando formas diferentes mobilizar ferro entre espécies.

Diversos estudos vinculam as alterações da magnitude do fornecimento e/ou disponibilidade do ferro no fitoplâncton, mediante eventos naturais, experimentos *in vitro* ou *in situ*. O teor de ferro intracelular basicamente está influenciado por diversos fatores biológicos, desde a fisiologia (incluídas taxas de crescimento, eficiência fotosintética) até mudanças da comunidade do fitoplâncton.

Na atualidade, não existe evidência que espécies da família Symbiodiniaceae excretam sideróforos, pelo que se pode assumir que a mobilização de ferro é mediante mecanismos de assimilação na membrana celular baseadas na redução de Fe(III) extracelular (Blaby-Haas & Merchant, 2012). Este pode explicar o baixo teor de ferro intracelular para o caso do complexo FeDFO altamente hidrofílico e estável ($p[Fe] = 26,5$) (Vlachodimitropoulou Koumoutsea *et al.*, 2015). Esta observação é consistente com em relação a outros eucariontes marinhos (Hopkinson & Morel, 2009), que usam DFO como limitante de ferro em experimentos de cultivo para eucariontes e procariontes. Por outro lado, um parâmetro que pode contribuir à internalização de ferro é lipofilicidade, cuja ordem é $Fe(DFX)_2 \gg Fe(DFP)_3$, $FeHBED$, $>FeDFO$ (Faller *et al.*, 2000; Vlachodimitropoulou Koumoutsea *et al.*, 2015). Dessa forma, possivelmente esses compostos poderiam transportar ferro ao interior das células e conseguir dissociar o ferro no ambiente intracelular. Adicionalmente, foi demonstrando quando as espécies da família Symbiodiniaceae se encontram na forma livre, podem obter nutrientes mediante captura de presas pequenas, para compensar as demandas pela limitação de ferro (Jin *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2015).

4.5 Efeito do choque térmico na variação da população do *Breviolum minutum* exposto aos complexos do ferro(III)

Os eventos onde os corais perdem seus fotossimbiontes dinoflagelados (que aportam a maioria de nutrientes ao hospedeiro) pertencentes à família Symbiodiniaceae estão aumentando com frequência e intensidade. Estes eventos, denominados branqueamentos, estão frequentemente relacionados a leves aumentos de temperatura nos recifes coralíneos (Cziesielski *et al.* 2019). Enquanto os eventos de branqueamento intensificam-se em todo o mundo, há uma necessidade de identificar os fatores biológicos, físicos ou químicos que podem aumentar a resistência e resiliência dos corais frente ao branqueamento induzido por estresse térmico.

A família Symbiodiniaceae exibe uma alta diversidade genética (LaJeunesse *et al.*, 2018), e evidências sugerem variável susceptibilidade entre os tipos genéticos frente a aumentos de temperatura (Tchernov *et al.*, 2004). A importância das diferenças nos simbiontes da família Symbiodiniaceae na resistência ao branqueamento e a resiliência foi bem documentada para corais duros e moles. Portanto, é importante conhecer as respostas fisiológicas destes dinoflagelados endossimbióticos frente ao estresse térmico, o que pode dar importantes indicativos relacionados à persistência e resiliência das comunidades coralíneas. Investigações prévias no holobionte (corais e seus simbiontes) exposto a condições de limitação de ferro em combinação a um aumento prolongado da temperatura reportaram o estresse como sendo uma das causas de perturbações fisiológicas que levam a eventos de branqueamento em corais (Biscéré *et al.* 2018;; Shick *et al.*, 2011). Adicionalmente Reich e colaboradores (2020) realizaram um estudo comparativo medindo respostas fisiológicas entre duas espécies do gênero *Breviolum* com distintos perfis térmicos para avaliar as diferenças de assimilação de ferro frente a aumentos de temperatura, mostrando que baixas concentrações de ferro diminuem a tolerância térmica para as duas espécies e a proliferação celular está vinculada de forma inversa aos aumentos de temperatura, o que contribuiria ao branqueamento nos corais

Breviolum minutum é uma espécie termossensível em comparação às outras espécies que formam simbiose com cnidários em águas tropicais. Tem-se que para uma exposição curta acima de 4 °C ou prolongada a temperaturas 2 °C mais altas que o máximo médio pode provocar branqueamento nos corais (Jokiel & Coles, 1990). A temperaturas acima de 30 °C gera alta produção de EROs, que são difundidos através de membrana e podem danificar o hospedeiro (Suggett *et al.*, 2008). Embora a exposição a temperaturas altas em *Breviolum minutum* tenha durado pouco tempo em comparação a eventos naturais de branqueamento, acompanhado da suplementação de ferro em forma

complexos, este trabalho pode oferecer valiosa informação acerca de respostas na variação da população frente a aumentos repentinos de temperatura.

Cabe destacar que os quelantes aplicados na experiência mantêm o ferro(III) inativo prevenindo reações associadas ao estresse oxidativo, exceto para o complexo aminopolycarboxilato FeEDTA que gera reações do ciclo redox de ferro (Steinhauser *et al.*, 2004).

O primeiro experimento consistiu na exposição prévia das microalgas aos complexos de ferro e depois submetê-las ao (+) **choque térmico** por um período de quatro horas. A contagem de células 24 após a exposição ao choque térmico (+) mostrou uma caída drástica na população de aproximadamente 95 – 99% para todos os tratamentos, no entanto para os tratamentos com FeDFO e FeEDTA o efeito foi muito marcado pelo que não foi possível determinar a densidade celular devido à baixa população de microalgas (visualmente as amostras submetidas a contagem não apresentavam movimentação; **Figura 23A**), enquanto que para as microalgas (-) **controle** expostas aos tratamentos continuaram a fase de crescendo (**Figura 23B**). Após sete dias do choque térmico, a contagem de células registrou um aumento na população para os cultivos expostos ao (+) **choque térmico** e (-) **controle** em torno a 4×10^4 cel. mL⁻¹ (**Figura 23A - B**).

Adicionalmente, de acordo com a **figura 23A**, no dia sete, as populações para os tratamentos não apresentam diferenças significativas entre tratamentos e controle. As taxas de crescimento foram maiores para *Breviolum minutum* exposto ao **choque térmico** (+), em particular para o tratamento com Fe(DFX)₂. Devido às baixas populações nos tratamentos com FeDFO e FeEDTA não foi possível determinar a velocidade de crescimento, embora seja possível inferir que a taxa de crescimento foi maior em comparação com os outros tratamentos após o **choque térmico** (+). Baseado nessa observação de exposição aos complexos Fe(DFX)₂, FeDFO e FeEDTA, é possível que esse resultado possa ter implicações positivas na repopulação das zooxantelas ANTES de acontecer os eventos de branqueamento. Isso tem implicações importantes no fornecimento e regulação de ferro no simbiote, pois a disponibilidade de ferro pode influir na capacidade da microalga, após repentinos pulsos de temperatura, de aumentar a população e gerar enzimas antioxidantes que contêm ferro.

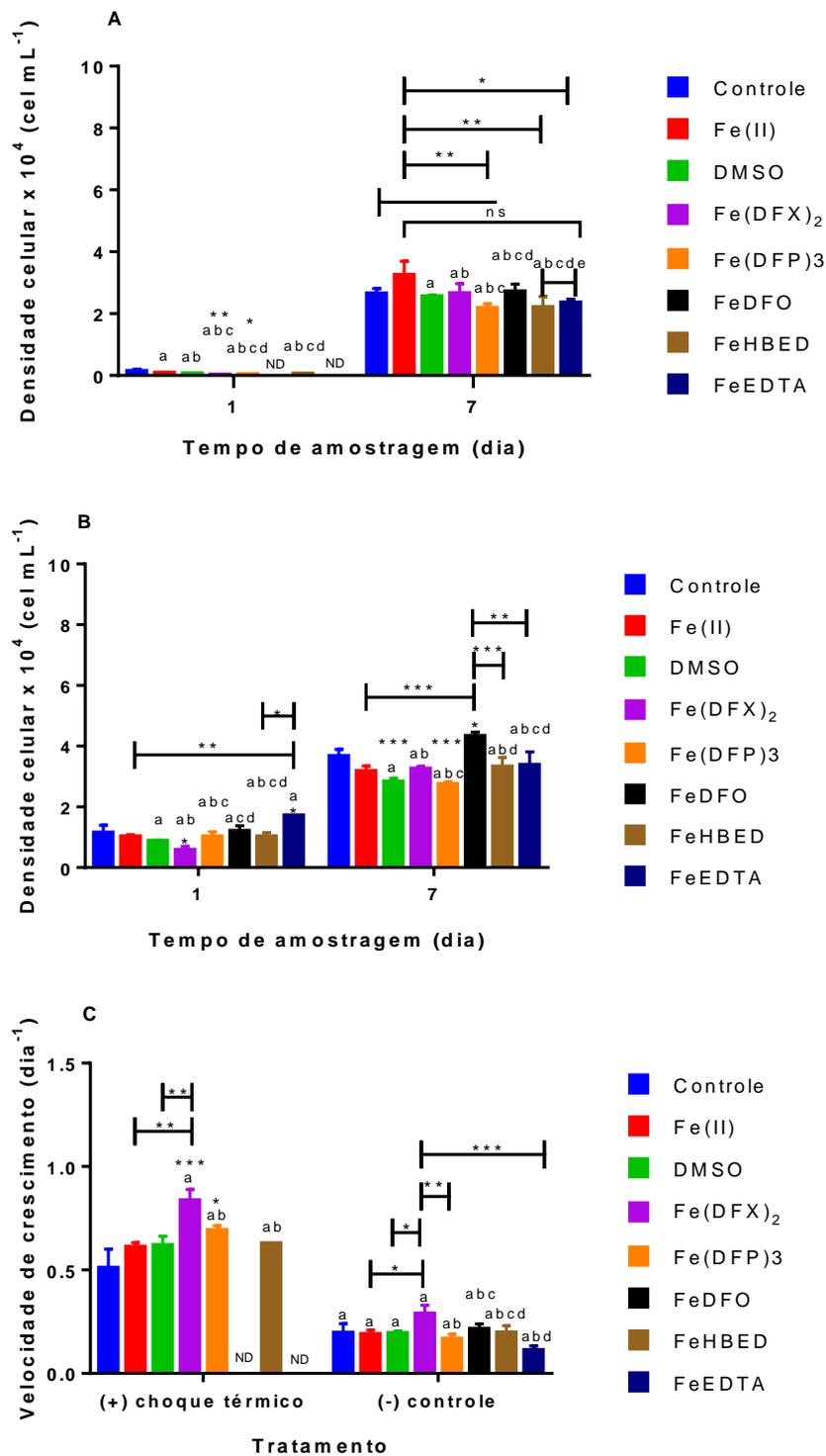


Figura 23 Impacto do choque térmico ($33,5 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ por 4 horas) no crescimento após 1 e 7 dias em *Breviolum minutum* cultivado em meio Guillard-F/2 isento de ferro com a adição de complexos de ferro(III). Os complexos de ferro foram adicionados **ANTES** do choque térmico. **A** Densidade celular nas culturas submetidas ao (+) **choque térmico**; **B** Densidade celular nas culturas (-) **controle** (desenvolvendo-se a $20,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$); **C** Comparação das taxas máximas de crescimento (μ) nas culturas controle e estressadas pelo calor. Os dados representam os valores médios \pm DP das triplicatas. ND = Não detectado. Com diferenças estatísticas: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. As barras com letras iguais não são significativamente diferentes $p > 0,05$, ns = não significativo

Para a segunda parte do experimento, a variação da população entre os dias um e sete e velocidade de crescimento para a espécie *Breviolum minutum* submetida ao choque térmico na ausência de ferro (isto é, os complexos foram adicionados após o choque térmico) apresentam-se na **figura 24**.

Os resultados mostram valores semelhantemente baixos na densidade celular 24 horas após a suplementação dos tratamentos no (+) **choque térmico**, mostrando uma diminuição de aproximadamente 98 – 99% na população para todos os tratamentos (**Figura 24A**). Por outro lado, para as microalgas (-) **controle**, tiveram o crescimento continuado com populações entre $4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ cel mL⁻¹ (**Figura 24B**). Após sete dias no (+) **choque térmico** seguido da adição dos complexos, a contagem de células mostrou um aumento repentino na população por volta de $6,8 \times 10^4$ cel mL⁻¹ para o controle, e $2,6 \times 10^4$ cel mL⁻¹ para FeEDTA, com diferenças significativas para todos os tratamentos, em quanto que o (-) **controle** continuou o crescimento com populações variáveis (**Figura 24B**). As mudanças na velocidade de crescimento refletiram fortemente como resultado das altas populações atingidas em *Breviolum minutum* APÓS adicionar os tratamentos comparados com a variante anterior do experimento (**Figura 24C**). As velocidades de crescimento não apresentam diferenças significativas entre o controle e os tratamentos exceto para Fe(DFX)₂ e FeEDTA.

Se por um lado o ferro permanece estável na forma Fe(III) ligado aos ligantes usados neste estudo, a forma Fe(II) tem uma vida média curta (de minutos a horas) oxidando-se em águas marinhas (Santana-Casiano *et al.*, 2005). Fica evidente que a suplementação de ferro APÓS um aumento repentino de temperatura tem um efeito positivo maior no crescimento (**Figura 23C**) no dinoflagelado, sem importar a fonte de ferro fornecida, em comparação com a suplementação prévia (**Figura 24C**) do (+) **choque térmico**. Essas altas taxas de crescimento podem ser benéficas para os hospedeiros APÓS eventos de branqueamento, pois para os corais, é ótimo para permitir adquirir grandes populações de simbiontes rapidamente ou recuperarem-se em pouco tempo, independente do ferro. Experimentos futuros deveriam considerar explorar a administração de carbono em combinação com os corais.

Estudos em *Fugacium kawagutii* cultivado a temperaturas moderadamente altas em combinação com diferentes concentrações de ferro foram realizados, observando-se que mantiveram o crescimento após o estresse térmico durante sete dias, concluindo que a administração adequada de ferro suporta o crescimento (Rodriguez & Ho, 2018).

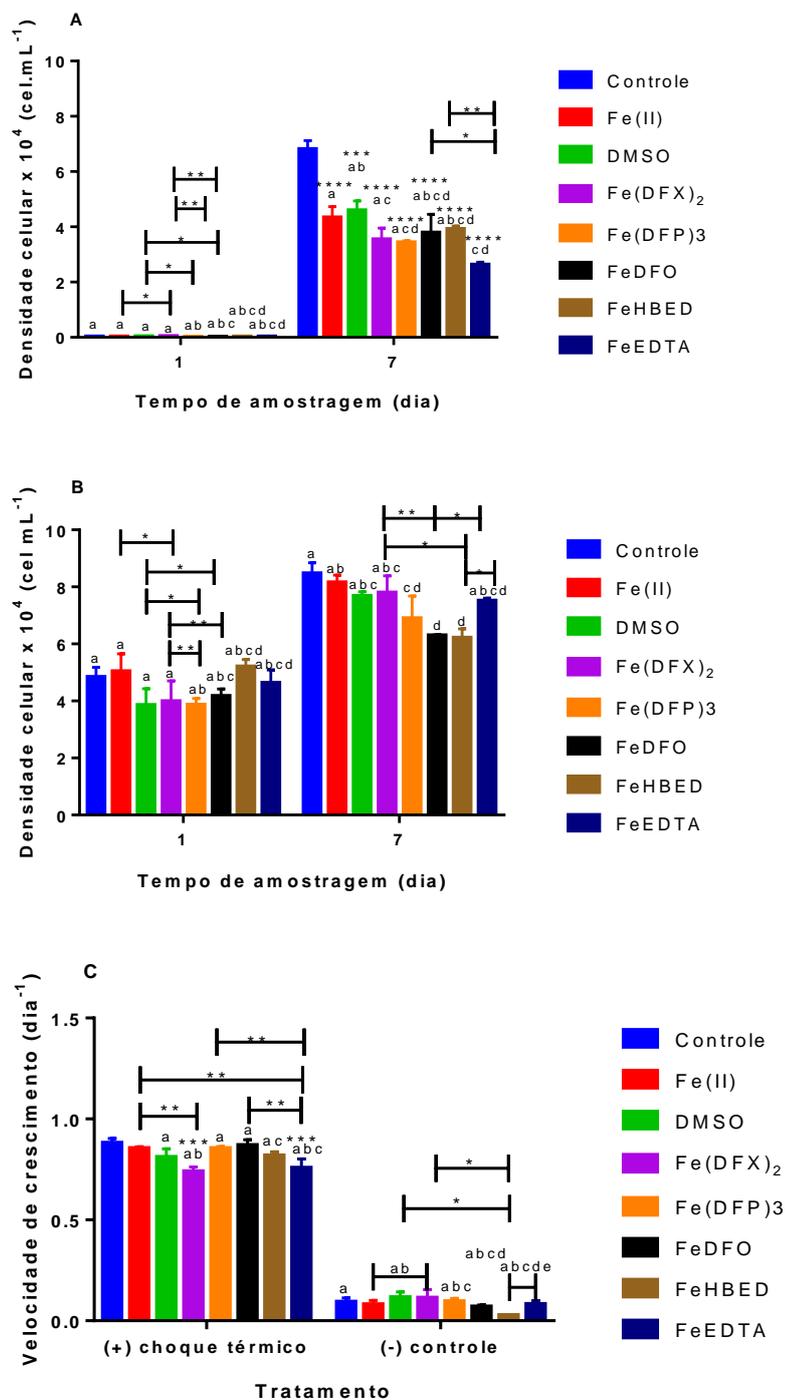


Figura 24 Impacto do choque térmico ($34,8 \pm 0,4$ ° C por 4 horas) no crescimento após 1 e 7 dias em *Breviolum minutum* em meio Guillard-F / 2 isento de ferro com a adição de ferro(III) Os complexos de ferro foram adicionados **APÓS** o choque térmico. **A** Densidade celular nas culturas submetidas ao (+) **choque térmico**; **B** Densidade celular nas culturas (-) **controle** (desenvolvendo-se a $22 \pm 0,7$ ° C); **C** Comparação das taxas máximas de crescimento (μ) nas culturas controle e estressadas pelo calor. Os dados representam os valores médios \pm DP das triplicatas. Com diferenças estatísticas: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. As barras com letras iguais não são significativamente diferentes $p > 0,05$.

4.6 Teste de toxicidade do complexo Fe(8-HQ) para espécie *Durusdinium glynni*

O complexo Fe(8-HQ) é altamente estável e lipofílico (Pierre, Baret & Serratrice, 2003), sendo usado para elevar a concentração de ferro em células animais e determinar o efeito da reação de espécies reativas de oxigênio sobre os lipídeos intracelulares (Oubidar *et al.*, 1996). A atividade antimicrobiana do complexo Fe(8-HQ) foi provada em bactérias cuja ação primordialmente está associada a transporte passivo pela membrana seguido da dissociação do ligante (8-HQ) intracelularmente, e em seguida o ferro forma ligações com proteínas ou DNA (Albert *et al.*, 1953; Albert *et al.*, 1954). Por outro lado, Fang *et al.* sugerem que o Fe(8-HQ) induz rapidamente sobrecarga de ferro intracelular em células animais, seguida de produção excessiva de EROs, provocando morte celular (Fang, Yu, Ding, Han, & Feng, 2018). Os mecanismos deste fenômeno ainda são desconhecidos.

O teste da toxicidade foi realizado na espécie *D. glynni.*, em fase exponencial de crescimento, exposta ao complexo Fe(8-HQ), para determinar a concentração mínima inibitória (IC50). Ensaio preliminares mostraram que o complexo Fe(8-HQ) impede o crescimento das microalgas durante 21 dias expostos uma concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,05% v v⁻¹ DMSO). Em contraste a população continua aumentando frente à exposição ao quelante 8-HQ (concentração final = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em DMSO). Estudos toxicológicos feitos em dinoflagelados expostos a diferentes concentrações de DMSO demonstraram que a valores baixos 1% não afetavam o crescimento (Okumura *et al.*, 2001).

Durusdinium glynni foi incubado em meio F/2-Guillard suplementado com Fe(8-HQ), a diferentes concentrações (50 – 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em DMSO, 0,1 % v v⁻¹ % DMSO) exposto ao complexo durante 24 horas. A partir da curva dose-resposta (**Figura 25B**) o valor da concentração média inibitória (IC50) foi de $9,5 \pm 0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. O período de aclimação da microalga exposto às concentrações 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi de 1 dia para iniciar a fase exponencial, enquanto para 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o crescimento continua passada as 48 horas. A queda da população após 1 hora é para concentrações superiores a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (**Figura 25A**). Para concentrações superiores a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a taxa de crescimento é nula (registrado visualmente sem apresentam movimentação).

A toxicidade do complexo Fe(8-HQ) é consistente com dados publicados comparado com a ação citotóxica (fungicida e bactericida) do quelante 8-HQ (Prachayasittikul *et al.*, 2013), embora fique demonstrada uma ação algicida, que pode

ser interessante para controlar a proliferação de algas tóxicas ou eliminar algas no tratamento de águas de abastecimento público.

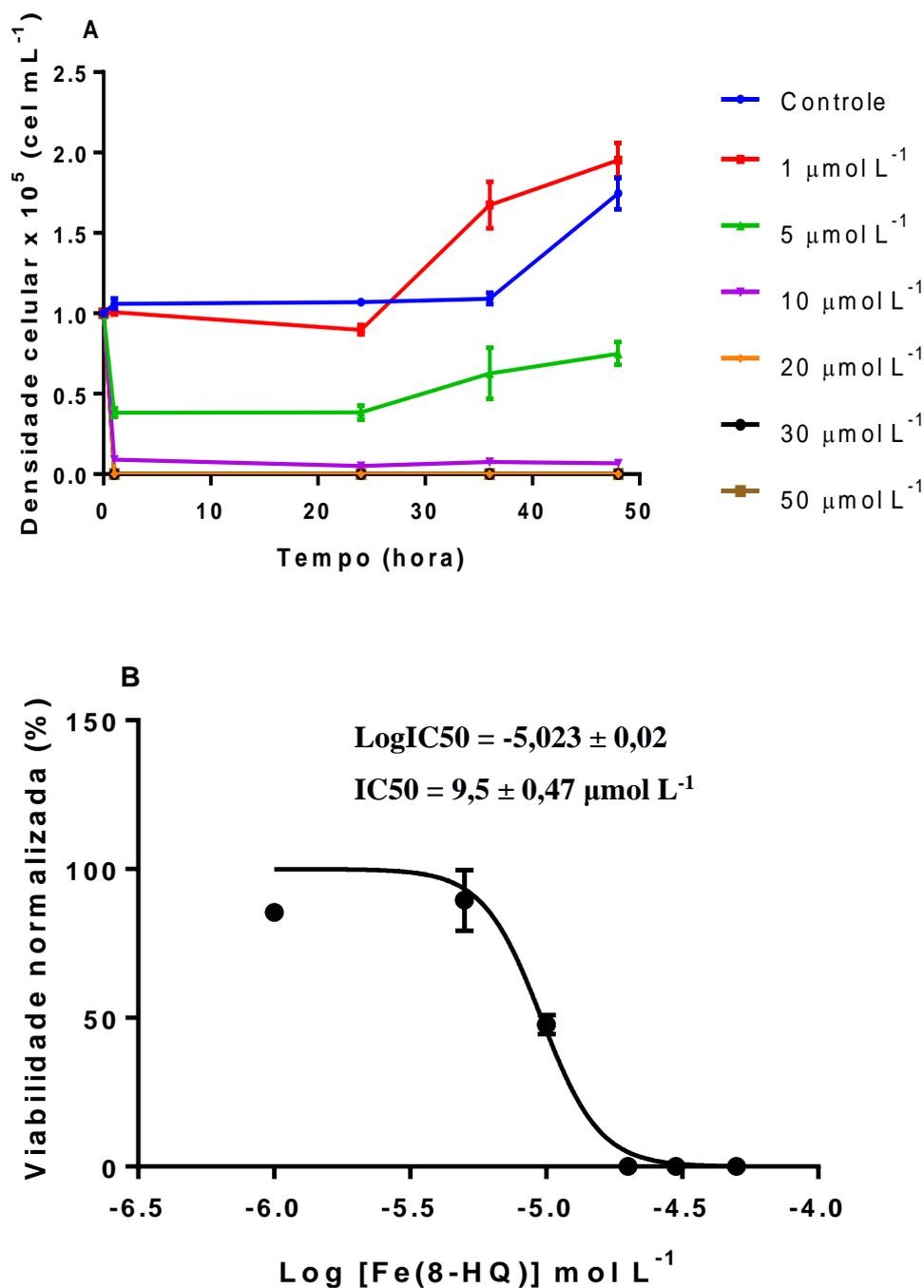


Figura 25. Exposição de *Durusdinium glynni* ao complexo Fe(8-HQ) **A.** Variação na população frente a diferentes concentrações do complexo Fe(8-HQ), as concentrações foram determinadas para 1, 24, 36 e 48 horas. **B** Curva doses-resposta após 24 horas de exposição a diferentes concentrações (50, 30, 20, 10, 5 e 1 μmol L⁻¹) do complexo Fe(8-HQ). Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3)

5. CONCLUSÕES

O uso de complexos de ferro de diferentes famílias químicas com características bem definidas permitiu obter dados relevantes em relação a parâmetros fisiológicos como crescimento nos dinoflagelados pertencentes à família Symbiodiniaceae, e sua relação na variação de população com o aumento de temperatura em *Breviolum minutum*. Não foi observado um padrão de armazenamento do ferro e de biomassa em resposta ao choque térmico. O complexo Fe(8-HQ) apresentou toxicidade para as microalgas.

Para comprovar em que grau os complexos podem atravessar as membranas celulares, realizou-se teste de lipofilicidade. e em ordem crescente temos $\text{Fe(DFX)}_2 > \text{Fe(8-HQ)} > \text{FeHBED} > \text{Fe(DFP)}_3 > \text{FeDFO} > \text{FeEDTA}$.

As respostas para a exposição aos tratamentos foram variáveis, ficando demonstrado que nas espécies da família Symbiodiniaceae deficientes em ferro (controle e DMSO) o crescimento é reprimido, sendo esse efeito mais marcado em *F. kawagutii*, dando baixos valores nas taxas de crescimento e ferro intracelular em comparação com os tratamentos que contêm ferro. Pelo contrário, em geral a suplementação de Fe(II) permitiu atingir altas taxas de crescimento e maior quantidade de ferro intracelular. De modo geral, ferro livre e ferro complexado mantiveram o crescimento exponencial até o dia vinte e um.

Pode-se notar que *S. microadriaticum* teve perfis e taxas de crescimento similares para todos os tratamentos o que pode sugerir que a mobilização de ferro é independente da fonte que subministra o íon metálico. Se obtiveram similaridades no crescimento, taxas de crescimento e ferro intracelular para as espécies *B. minutum*, *E. voratum* e *F. kawagutii*, com o complexo mais lipofílico Fe(DFX)_2 , e um resultado contrário foi obtido com FeHBED. O teor de ferro intracelular acompanhou a mesma tendência antes mencionado exceto para *S. microadriaticum* que apresentou maior teor de ferro intracelular com FeHBED. Cabe ressaltar que *E. voratum* atingiu altas populações e baixo teor de ferro intracelular em todos os tratamentos em comparação às outras espécies, conforme atestado pelo ferro intracelular. Foi interessante notar que a espécie *C. goreau* apresentou um resultado oposto em comparação às outras espécies: suas taxas de crescimento foram mais baixas frente aos complexos em comparação aos tratamentos controle, DMSO e ferro livre, provavelmente por algum mecanismo de mobilização e utilização diferente de ferro, ou os complexos podem ter efeitos tóxicos, além do que a exposição frente ao ferro livre e Fe(DFX)_2 produziu alto teor de ferro intracelular.

A exposição aos quelantes livres resultou em baixas taxas de crescimento e teor de ferro intracelular em todas as espécies, com um maior efeito para *S. microadriaticum*

e *F. kawagutii*. Efeitos positivos no crescimento foram obtidos para as espécies *B. minutum*, *C. goreau* e *E. voratum* exposto ao quelante DFP.

Breviolum minutum, uma das linhagens mais termossensíveis, apresentou marcados resultados na população frente choque térmico extremo (34 °C) prévia ou posterior exposição aos tratamentos. Se confirmou que as temperaturas altas exercem um efeito negativo em *B. minutum* com uma caída drástica na população nas duas variantes de exposição aos tratamentos. Concluiu-se que a exposição de *B. minutum* ao estresse térmico resulta em altas taxas de crescimento frente à adição antes ou depois do (+) **choque térmico** dos tratamentos em comparação aos (-) **controles**. Embora a adição dos tratamentos antes ou depois do choque térmico tenham uma marcada diferença nas taxas de crescimento, a prévia suplementação dos tratamentos, exceto para os tratamentos com Fe(DFX)₂, FeDFO e FeEDTA, pois resulta em menores populações (sem diferenças significativas entre tratamentos) e taxas de crescimento em comparação com a suplementação sete dias após o evento. A adição dos tratamentos após o choque térmico tem efeito independentemente da forma de ferro no crescimento. Esses resultados indicam que para situações de estresse, o ferro não tem um efeito positivo para enfrentar eventos de exposição a temperaturas altas (entenda-se como enzimas antioxidantes).

Finalmente, determinamos a concentração mínima inibitória (IC50) para o complexo Fe(8-HQ) em *Durusdinium glynni*, obtendo um valor de 9,5 µmol L⁻¹, o que sugere que esse complexo tem uma promissora e inédita aplicação algicida.

6. REFERÊNCIAS

- Anderegg, G., L'Eplattenier, F., & Schwarzenbach, G. (1963). Hydroxamatkomplexe III. Eisen(III)-Austausch zwischen Sideraminen und Komplexonen. Diskussion der Bildungskonstanten der Hydroxamatkomplexe. *Helvetica Chimica Acta*, 46(4), 1409–1422. <https://doi.org/10.1002/hlca.19630460436>
- Aumont, O., & Bopp, L. (2006). Globalizing results from ocean in situ iron fertilization studies. *Global Biogeochemical Cycles*, 20(2), 1–15. <https://doi.org/10.1029/2005GB002591>
- B. Rodriguez, I., Lin, S., Ho, J., & Ho, T.-Y. (2016). Effects of Trace Metal Concentrations on the Growth of the Coral Endosymbiont *Symbiodinium Kawagutii*, 7(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00082>
- Baird, A. H., & Marshall, P. A. (1998). Mass bleaching of corals on the Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, 17(4), 376–376. <https://doi.org/10.1007/s003380050142>
- Bannochie, C. J., & Martell, A. E. (1989). Affinities of racemic and meso forms of N,N'-ethylenebis[2-(o-hydroxyphenyl)glycine] for divalent and trivalent metal ions. *Journal of the American Chemical Society*, 111(13), 4735–4742. <https://doi.org/10.1021/ja00195a029>
- Berman-Frank, I., Cullen, J. T., Shaked, Y., Sherrell, R. M., & Falkowski, P. G. (2001). Iron availability, cellular iron quotas, and nitrogen fixation in *Trichodesmium*. *Limnology and Oceanography*, 46(6), 1249–1260. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.6.1249>
- Biscéré, T., Ferrier-Pagès, C., Gilbert, A., Pichler, T., & Houlbrèque, F. (2018). Evidence for mitigation of coral bleaching by manganese. *Scientific Reports*, 8(1), 16789. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34994-4>
- Blaby-Haas, C. E., & Merchant, S. S. (2012). The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(9), 1531–1552. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.010>
- Blaby-Haas, C. E., & Merchant, S. S. (2017). Regulating cellular trace metal economy in algae. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.06.005>
- Botebol, H., Sutak, R., Scheiber, I. F., Blaiseau, P.-L., Bouget, F.-Y., Camadro, J.-M., & Lesuisse, E. (2014). Different iron sources to study the physiology and biochemistry of iron metabolism in marine micro-algae. *BioMetals*, 27(1), 75–88. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9688-1>
- Brittenham, G. (1992). Development of iron-chelating agents for clinical use [editorial; comment]. *Blood*, 80(3), 569–574. <https://doi.org/10.1182/blood.V80.3.569.569>
- Butler, A. (1998). Acquisition and Utilization of Transition Metal Ions by Marine Organisms. *Science*, 281(5374), 207–209. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.207>
- Chauka, L. J. (2013). Diversity of the Symbiotic Alga *Symbiodinium* in Tanzanian Scleractinian Corals. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 11(1), 67–76. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/wiojms/article/view/78566>
- Chen, M., Wang, W. X., & Guo, L. (2004). Phase partitioning and solubility of iron in natural seawater controlled by dissolved organic matter. *Global Biogeochemical Cycles*, 18(4), 1–12. <https://doi.org/10.1029/2003GB002160>
- Codd, R., Richardson-Sanchez, T., Telfer, T. J., & Gotsbacher, M. P. (2018). Advances in the Chemical Biology of Desferrioxamine B. *ACS Chemical Biology*, 13(1), 11–25. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00851>
- Cziesielski, M. J., Schmidt Roach, S., & Aranda, M. (2019). The past , present , and

- future of coral heat stress studies. *Ecology and Evolution*, (9), 10055–10066.
<https://doi.org/10.1002/ece3.5576>
- Davy, S. K., Allemand, D., & Weis, V. M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 229–261. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05014-11>
- Downs, C. ., Fauth, J. E., Halas, J. C., Dustan, P., Bemiss, J., & Woodley, C. M. (2002). Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 533–543. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00907-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00907-3)
- El Jay, A. (1996). Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(1), 84–90.
<https://doi.org/10.1007/BF00203911>
- Eplattenier, F. L., Murase, I., & Martell, A. E. (1967). New Multidentate Ligands. VI. Chelating Tendencies of N,N-Di (2-hydroxybenzyl) ethylenediamine-N,N-diacetic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, 89(4), 837–843.
- Esposito, B. P. (2003). Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*, 102(7), 2670–2677.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0807>
- Estrada, N., de Jesús Romero, M., Campa-Córdova, A., Luna, A., & Ascencio, F. (2007). Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146(4), 502–510.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.003>
- Evers, A., D. Hancock, R., E. Martell, A., & J. Motekaitis, R. (1989). Metal Ion Recognition in Ligands with Negatively Charged Oxygen Donor Groups. Complexation of Fe(III), Ga(III), In(III), Al(III), and Other Highly Charged Metal Ions. *Inorganic Chemistry*, 28(11), 2189–2195.
<https://doi.org/10.1021/ic00310a035>
- Falkowski, P. G., Barber, R. T., & Smetacek, V. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 281(5374), 200–206.
<https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>
- Faller, B., Spanka, C., Sergejew, T., & Tschinke, V. (2000). Improving the Oral Bioavailability of the Iron Chelator HBED by Breaking the Symmetry of the Intramolecular H-Bond Network †. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(8), 1467–1475. <https://doi.org/10.1021/jm990261n>
- Fang, S., Yu, X., Ding, H., Han, J., & Feng, J. (2018). Effects of intracellular iron overload on cell death and identification of potent cell death inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(1), 297–303.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.019>
- Ferrier-Pagès, C., Schoelzke, V., Jaubert, J., Muscatine, L., & Hoegh-Guldberg, O. (2001). Response of a scleractinian coral, *Stylophora pistillata*, to iron and nitrate enrichment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259(2), 249–261. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00241-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00241-6)
- Gordon, R. M., Johnson, K. S., & Coale, K. H. (1998). The behaviour of iron and other trace elements during the IronEx-I and PlumEx experiments in the Equatorial Pacific. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 45(6), 995–1041. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(98\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(98)00012-5)
- Grant, A. J., Graham, K., Frankland, S., & Hinde, R. (2003). Effect of copper on algal-host interactions in the symbiotic coral *Plesiastrea versipora*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(4), 383–390. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00034-2)
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In W. L. Smith & M. H. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*

- (pp. 29–60). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Hasan, K., Fowler, C., Kwong, P., Crane, A. K., Collins, J. L., & Kozak, C. M. (2008). Synthesis and structure of iron(III) diamine-bis(phenolate) complexes. *Dalton Transactions*, (22), 2991–2998. <https://doi.org/10.1039/b802274g>
- Heinz, U., Hegetschweiler, K., Acklin, P., Faller, B., Lattmann, R., & Schnebli, H. P. (1999). 4-[3,5-bis(2-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl]-benzoic acid: A novel efficient and selective iron(III) complexing agent. *Angewandte Chemie - International Edition*, 38(17), 2568–2570. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990903\)38:17<2568::AID-ANIE2568>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990903)38:17<2568::AID-ANIE2568>3.0.CO;2-C)
- Hoard, J. L., Lind, M., & Silvertown, J. V. (1961). THE STEREOCHEMISTRY OF THE ETHYLENEDIAMINETETRAACETATOQUOFERRATE (III) ION 1. *Journal of the American Chemical Society*, 83(12), 2770–2771. <https://doi.org/10.1021/ja01473a040>
- Hoegh-Guldberg, O., Pendleton, L., & Kaup, A. (2019). People and the changing nature of coral reefs. *Regional Studies in Marine Science*, 30, 100699. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100699>
- Hogle, S. L., Cameron Thrash, J., Dupont, C. L., & Barbeau, K. A. (2016). Trace metal acquisition by marine heterotrophic bacterioplankton with contrasting trophic strategies. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(5), 1613–1624. <https://doi.org/10.1128/AEM.03128-15>
- Hopkinson, B. M., & Morel, F. M. M. (2009). The role of siderophores in iron acquisition by photosynthetic marine microorganisms. *BioMetals*, 22(4), 659–669. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9235-2>
- Hughes, T. P., Kerry, J. T., Álvarez-Noriega, M., Álvarez-Romero, J. G., Anderson, K. D., Baird, A. H., ... Wilson, S. K. (2017). Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature*, 543(7645), 373–377. <https://doi.org/10.1038/nature21707>
- Hunter, K. A., & Boyd, P. W. (2007). Iron-binding ligands and their role in the ocean biogeochemistry of iron. *Environmental Chemistry*, 4(4), 221–232. <https://doi.org/10.1071/EN07012>
- Hutchins, D. A., & Boyd, P. W. (2016). Marine phytoplankton and the changing ocean iron cycle. *Nature Climate Change*, 6(12), 1072–1079. <https://doi.org/10.1038/nclimate3147>
- Hutchins, D. A., Witter, A. E., Butler, A., & Luther, G. W. (1999). Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature*, 400(6747), 858–861. <https://doi.org/10.1038/23680>
- Iglic, K. L. (2011). *Trace metal limitation and its role in oxidative stress of coral algal symbionts; implications for thermally induced coral bleaching events*. University of Western Ontario. Retrieved from ir.lib.uwo.ca/etd/282/
- Jermy, A. (2009). Symbiosis: A partnership cast in iron. *Nature Reviews Microbiology*, 7(11), 760. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2255>
- Jin, H., Du, Y., Seon, N., Suk, A., Ah, K., & Yeon, S. (2012). Heterotrophic feeding as a newly identified survival strategy of the dinoflagellate Symbiodinium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12604–12609. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204302109>
- Johnson, K. S., Michael Gordon, R., & Coale, K. H. (1997). What controls dissolved iron concentrations in the world ocean? *Marine Chemistry*, 57(3–4), 137–161. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(97\)00043-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(97)00043-1)
- Jokiel, P. L., & Coles, S. L. (1990). Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs*, 8(4), 155–162. <https://doi.org/10.1007/BF00265006>

- Jonas, S. K., & Riley, P. A. (1991). The effect of ligands on the uptake of iron by cells in culture. *Cell Biochemistry and Function*, 9(4), 245–253. <https://doi.org/10.1002/cbf.290090406>
- Jones, G. B., & King, S. (2015). Dimethylsulphoniopropionate (DMSP) as an Indicator of Bleaching Tolerance in Scleractinian Corals. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3, 444–465. <https://doi.org/10.3390/jmse3020444>
- Karpishin, T. B., Gebhard, M. S., Solomon, E. I., & Raymond, K. N. (1991). Spectroscopic studies of the electronic structure of iron(III) tris(catecholates). *Journal of the American Chemical Society*, 113(8), 2977–2984. <https://doi.org/10.1021/ja00008a028>
- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research*, 212–213, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Kontoghiorghes, G. J. (1987). Structure/Iron binding activity of 1-hydroxypyrid-2-one chelators intended for clinical use. *Inorganica Chimica Acta*, 135(2), 145–150. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)83279-X](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)83279-X)
- Krachler, R., Krachler, R., Valda, A., & Keppler, B. K. (2019). Natural iron fertilization of the coastal ocean by “blackwater rivers.” *Science of The Total Environment*, 656, 952–958. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.423>
- Kudo, I., Noiri, Y., Nishioka, J., Taira, Y., Kiyosawa, H., & Tsuda, A. (2006). Phytoplankton community response to Fe and temperature gradients in the NE (SERIES) and NW (SEEDS) subarctic Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 53, 2201–2213. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2006.05.033>
- LaJeunesse, T. C. (2017). Validation and description of *Symbiodinium microadriaticum*, the type species of *Symbiodinium* (Dinophyta). *Journal of Phycology*, 53(5), 1109–1114. <https://doi.org/10.1111/jpy.12570>
- LaJeunesse, T. C., Parkinson, J. E., Gabrielson, P. W., Jeong, H. J., Reimer, J. D., Voolstra, C. R., & Santos, S. R. (2018). Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology*, 28(16), 2570–2580.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.008>
- Liochev, S. I. (1999). THE MECHANISM OF “FENTON-LIKE” REACTIONS AND THEIR IMPORTANCE FOR BIOLOGICAL SYSTEMS. A BIOLOGIST’S VIEW. In A. Sigel & H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems* (Vol. 36, pp. 1–39).
- Liu, X., & Millero, F. J. (2002a). The solubility of iron in seawater. *Marine Chemistry*, 77(1), 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(01\)00074-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(01)00074-3)
- Liu, X., & Millero, F. J. (2002b). The solubility of iron in seawater Xuewu. *Marine Chemistry*, 77, 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00050-4](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00050-4)
- Ma, R., Motekaitis, R. J., & Martell, A. E. (1994). Stability of metal ion complexes of N,N'-bis(2 -hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid. *Inorganica Chimica Acta*, 224, 151–155. [https://doi.org/10.1016/0020-1693\(94\)04012-5](https://doi.org/10.1016/0020-1693(94)04012-5)
- Martin, J. H. (1990). Glacial-interglacial CO₂ change: The Iron Hypothesis. *Paleoceanography*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1029/PA005i001p00001>
- Martin, J. H., & Fitzwater, S. E. (1988). Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature*, 331, 341–343. <https://doi.org/10.5151/cidi2017-060>
- Mattiello, I. D. L. V. (2014). *Avaliação de corantes para a detecção da viabilidade do fitoplâncton marinho*. Universidade de São Paulo, São Paulo. <https://doi.org/10.11606/D.21.2014.tde-02022015-135423>
- Mobarra, N., Shanaki, M., Ehteram, H., Nasiri, H., Sahmani, M., Saeidi, M., ... Azad, M. (2016). A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes.

- International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 10(4), 239–247. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27928480>
- Monzyk, B., & Crumbliss, A. L. (1982). Kinetics and Mechanism of the Stepwise Dissociation of Iron(III) from Ferrioxamine B in Aqueous Acid. *Journal of the American Chemical Society*, 104(18), 4921–4929. <https://doi.org/10.1021/ja00382a031>
- Morel, F. M. M. (2003). The Biogeochemical Cycles of Trace Metals in the Oceans. *Science*, 300(5621), 944–947. <https://doi.org/10.1126/science.1083545>
- Morel, F. M. M., Kustka, A. B., & Shaked, Y. (2008). The role of unchelated Fe in the iron nutrition of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 53(1), 400–404. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.1.0400>
- Moridani, M. Y., & O'Brien, P. J. (2001). Iron complexes of deferiprone and dietary plant catechols as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Biochemical Pharmacology*, 62(12), 1579–1585. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00821-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00821-8)
- Motekaitis, R. J., Martell, A. E., & Welch, M. J. (1990). Stabilities of Trivalent Metal Complexes of Phenolic Ligands Related to N,N'-Bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N, N'-diacetic Acid (HBED). *Inorganic Chemistry*, 29(8), 1463–1467. <https://doi.org/10.1021/ic00333a005>
- Nadal, P., García-Delgado, C., Hernández, D., López-Rayó, S., & Lucena, J. J. (2012). Evaluation of Fe-N,N'-Bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetate (HBED/Fe 3+) as Fe carrier for soybean (Glycine max) plants grown in calcareous soil. *Plant and Soil*, 360(1–2), 349–362. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1246-z>
- Nick, H., Acklin, P., Lattmann, R., Buehlmayer, P., Hauffe, S., Schupp, J., & Alberti, D. (2003). Development of Tridentate Iron Chelators: From Desferrithiocin to ICL670. *Current Medicinal Chemistry*, 10(12), 1065–1076. <https://doi.org/10.2174/0929867033457610>
- Nitschke, M. R., Craveiro, S. C., Brandão, C., Fidalgo, C., Serôdio, J., Calado, A. J., & Frommlet, J. C. (2020). Description of *Freudenthalidium* gen. nov. and *Halluxium* gen. nov. to Formally Recognize Clades Fr3 and H as Genera in the Family Symbiodiniaceae (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 56(4), 923–940. <https://doi.org/10.1111/jpy.12999>
- Nodwell, L. M., & Price, N. M. (2001). Direct use of inorganic colloidal iron by marine mixotrophic phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 46(4), 765–777. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.4.0765>
- Núñez, M. T., & Chana-Cuevas, P. (2018). New Perspectives in Iron Chelation Therapy for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals*, 11, 109. <https://doi.org/10.3390/ph11040109>
- Okumura, Y., Koyama, J., Takaku, H., & Satoh, H. (2001). Influence of Organic Solvents on the Growth of Marine Microalgae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 123–128. <https://doi.org/10.1007/s002440010229>
- Oliveri, V., & Vecchio, G. (2016). 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 120, 252–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.007>
- Oubidar, M., Boquillon, M., Marie, C., Bouvier, C., Beley, A., & Bralet, J. (1996). Effect of intracellular iron loading on lipid peroxidation of brain slices. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(6), 763–769. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00173-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00173-6)
- Pashalidis, I., & Kontoghiorghes, G. J. (2001). Molecular factors affecting the complex formation between deferiprone (L1) and Cu(II): Possible implications on efficacy

- and toxicity. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 51(12), 998–1003.
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1300151>
- Peixoto, R. S., Rosado, P. M., Leite, D. C. de A., Rosado, A. S., & Bourne, D. G. (2017). Beneficial microorganisms for corals (BMC): Proposed mechanisms for coral health and resilience. *Frontiers in Microbiology*, 8(341).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00341>
- Pierre, J.-, Baret, P., & Serratrice, G. (2003). Hydroxyquinolines as Iron Chelators. *Current Medicinal Chemistry*, 10(12), 1077–1084.
<https://doi.org/10.2174/0929867033457584>
- Pochon, X., & Gates, R. D. (2010). A new Symbiodinium clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.03.040>
- Porter, J., Gyparakis, M., Burke, L., Huehns, E., Sarpong, P., Saez, V., & Hider, R. (1988). Iron mobilization from hepatocyte monolayer cultures by chelators: the importance of membrane permeability and the iron-binding constant. *Blood*, 72(5), 1497–1503. <https://doi.org/10.1182/blood.V72.5.1497.1497>
- Porto, I., Granados, C., Restrepo, J. C., & Sánchez, J. A. (2008). Macroalgal-associated dinoflagellates belonging to the genus Symbiodinium in caribbean reefs. *PLoS ONE*, 3(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002160>
- Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., & Ruchirawat, S. (2013). 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 1157.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S49763>
- R., A., W., P., M., T., & K., K. (2002). The 1998 bleaching event and its aftermath on a coral reef in Belize. *Marine Biology*, 141(3), 435–447.
<https://doi.org/10.1007/s00227-002-0842-5>
- Raven, J. A., Evans, M. C. W., & Korb, R. E. (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynthesis Research*, 60(2–3), 111–149. <https://doi.org/10.1023/a:1006282714942>
- Reich, H. G., Rodriguez, I. B., LaJeunesse, T. C., & Ho, T. Y. (2020). Endosymbiotic dinoflagellates pump iron: differences in iron and other trace metal needs among the Symbiodiniaceae. *Coral Reefs*, 39, 915–927. <https://doi.org/10.1007/s00338-020-01911-z>
- Rodriguez, I. B., & Ho, T. (2018). Trace Metal Requirements and Interactions in Symbiodinium kawagutii General Culture Conditions for Batch. *Frontiers in Microbiology*, 9(142). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00142>
- Rodriguez, I. B., Lin, S., Ho, J., & Ho, T. Y. (2016). Effects of trace metal concentrations on the growth of the coral endosymbiont Symbiodinium kawagutii. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00082>
- Roe, K. L., Hogle, S. L., & Barbeau, K. A. (2013). Utilization of heme as an iron source by marine alphaproteobacteria in the roseobacter clade. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5753–5762. <https://doi.org/10.1128/AEM.01562-13>
- Rose, A. L., & Waite, T. D. (2003). Effect of Dissolved Natural Organic Matter on the Kinetics of Ferrous Iron Oxygenation in Seawater. *Environmental Science and Technology*, 37(21), 4877–4886. <https://doi.org/10.1021/es034152g>
- Samuni, A. M., Afeworki, M., Stein, W., Yordanov, A. T., DeGraff, W., Krishna, M. C., ... Brechbiel, M. W. (2001). Multifunctional antioxidant activity of HBED iron chelator. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(2), 170–177.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00459-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00459-7)
- Sanchez, N., Peterson, C. K., Gonzalez, S. V., Vadstein, O., Olsen, Y., & Ardelan, M. V. (2019). Effect of hydroxamate and catecholate siderophores on iron availability

- in the diatom *Skeletonema costatum*: Implications of siderophore degradation by associated bacteria. *Marine Chemistry*, (January), 0–1.
<https://doi.org/10.1016/J.MARCHEM.2019.01.005>
- Sanqiang, G., Fengli, Z., & Zhiyong, L. I. (2018). Genotype and Phylogenetic Diversity of Symbiodinium ITS2 Sequences Within Clade C in Three Typical Coral Species from Luhuitou Fringing Reef of the South China Sea. *Journal of Ocean University of China*, 17(6), 1411–1417. <https://doi.org/10.1007/s11802-018-3628>
- Santana-Casiano, J. M., González-Dávila, M., & Millero, F. J. (2005). Oxidation of Nanomolar Levels of Fe(II) with Oxygen in Natural Waters. *Environmental Science & Technology*, 39(7), 2073–2079. <https://doi.org/10.1021/es049748y>
- Santos, M. A. (2008). Recent developments on 3-hydroxy-4-pyridinones with respect to their clinical applications. Mono and combined ligand approaches. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(10–11), 1213–1224.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.033>
- Schoffman, H., Lis, H., Shaked, Y., & Keren, N. (2016). Iron–Nutrient Interactions within Phytoplankton. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01223>
- Šebestík, J., Šafařík, M., & Bouř, P. (2012). Ferric Complexes of 3-Hydroxy-4-pyridinones Characterized by Density Functional Theory and Raman and UV–vis Spectroscopies. *Inorganic Chemistry*, 51(8), 4473–4481.
<https://doi.org/10.1021/ic202004d>
- Shaked, Y., Kustka, A. B., & Morel, F. M. M. (2005). A general kinetic model for iron acquisition by eukaryotic phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 50(3), 872–882. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.3.0872>
- Shaw, A. Y., Chang, C., Hsu, M., Lu, P., Yang, C., Chen, H., ... Chern, M. (2010). Synthesis and structure-activity relationship study of 8-hydroxyquinoline-derived Mannich bases as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(7), 2860–2867. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.008>
- Shick, J. M., Iglíc, K., Wells, M. L., Trick, C. G., Doyle, J., & Dunlap, W. C. (2011). Responses to iron limitation in two colonies of *Stylophora pistillata* exposed to high temperature: Implications for coral bleaching. *Limnology and Oceanography*, 56(3), 813–828. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.3.0813>
- Song, P. C., Wu, T. M., Hong, M. C., & Chen, M. C. (2015). Elevated temperature inhibits recruitment of transferrin-positive vesicles and induces iron-deficiency genes expression in *Aiptasia pulchella* host-harbored Symbiodinium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 188, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.05.005>
- Stat, M., Carter, D., & Hoegh-guldberg, O. (2006). The evolutionary history of Symbiodinium and scleractinian hosts — Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8, 8, 23–43. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2006.04.001>
- Steinhauser, S., Heinz, U., Bartholomä, M., Weyliermüller, T., Nick, H., & Hegetschweiler, K. (2004). Complex formation of ICL670 and related ligands with Fe(III) and Fe(II). *European Journal of Inorganic Chemistry*, (21), 4177–4192.
<https://doi.org/10.1002/ejic.200400363>
- Suggett, D. J., Warner, M. E., Smith, D. J., Davey, P., Hennige, S., & Baker, N. R. (2008). Photosynthesis and production of hydrogen peroxide by Symbiodinium (Pyrrophyta) phylotypes with different thermal tolerances. *Journal of Phycology*, 44, 948–956. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00537.x>
- Sunda, W. G. (2012). Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Frontiers in Microbiology*, 3:204.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00204>

- Sunda, W. G., Swift, D. G., & Huntsman, S. A. (1991). Low iron requirement for growth in oceanic phytoplankton. *Nature*, *351*, 55–57.
<https://doi.org/10.1038/246170a0>
- Tchernov, D., Gorbunov, M. Y., de Vargas, C., Narayan Yadav, S., Milligan, A. J., Haggblom, M., & Falkowski, P. G. (2004). Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(37), 13531–13535.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0402907101>
- Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. (1995). *OECD Publishing*. <https://doi.org/10.1787/9789264069626-en>
- Trick, C. G., Bill, B. D., Cochlan, W. P., Wells, M. L., Trainer, V. L., & Pickell, L. D. (2010). Iron enrichment stimulates toxic diatom production in high-nitrate, low-chlorophyll areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(13), 5887–5892. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910579107>
- Turnquist, T. D., & Sandell, E. B. (1968). Stability constants of iron(III)-8-hydroxyquinoline complexes. *Analytica Chimica Acta*, *42*, 239–245.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)80304-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80304-4)
- Tury, S., Assayag, F., Bonin, F., Chateau-Joubert, S., Servely, J. L., Vacher, S., ... Callens, C. (2018). The iron chelator deferasirox synergises with chemotherapy to treat triple-negative breast cancers. *Journal of Pathology*, *246*(1), 103–114.
<https://doi.org/10.1002/path.5104>
- Twining, B. S., & Baines, S. B. (2013). The Trace Metal Composition of Marine Phytoplankton. *Annual Review of Marine Science*, *5*(1), 191–215.
<https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172322>
- Venera-Ponton, D. E., Diaz-Pulido, G., Rodriguez-Lanetty, M., & Hoegh-Guldberg, O. (2010). Presence of Symbiodinium spp. in macroalgal microhabitats from the southern Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, *29*(4), 1049–1060.
<https://doi.org/10.1007/s00338-010-0666-6>
- Vlachodimitropoulou Koumoutsea, E., Garbowski, M., & Porter, J. (2015). Synergistic intracellular iron chelation combinations: Mechanisms and conditions for optimizing iron mobilization. *British Journal of Haematology*, *170*(6), 874–883.
<https://doi.org/10.1111/bjh.13512>
- Vraspir, J. M., & Butler, A. (2008). Chemistry of Marine Ligands and Siderophores. *Annual Review of Marine Science*, *1*(1), 43–63.
<https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163712>
- Weger, H. G., Lam, J., Wirtz, N. L., Walker, C. N., & Treble, R. G. (2009). High stability ferric chelates result in decreased iron uptake by the green alga *Chlorella kessleri* owing to decreased ferric reductase activity and chelation of ferrous iron. *Botany*, *87*(10), 922–931. <https://doi.org/10.1139/B09-063>
- Wells, M. L., & Trick, C. G. (2004). Controlling iron availability to phytoplankton in iron-replete coastal waters. *Marine Chemistry*, *86*, 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.marchem.2003.10.003>
- Wells, M., Shick, J. M., Trick, C. G., Dunlap, W., & Long, P. (2011). *Effects of Trace Metal Limitation on Oxidative Stress in Zooxanthellae and Its Role in Coral Bleaching*. University of Maine Office of Research and Sponsored Programs: Grant Reports. Retrieved from
https://digitalcommons.library.umaine.edu/orsp_reports/291/
- Worms, I., Simon, D. F., Hassler, C. S., & Wilkinson, K. J. (2006). Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie*, *88*(11), 1721–1731.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.008>
- Wu, W., Yang, Y., Sun, N., Bao, Z., & Lin, S. (2020). Food protein-derived iron-

- chelating peptides: The binding mode and promotive effects of iron bioavailability. *Food Research International*, *131*(1), 108976.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108976>
- Xiang, T., Nelson, W., Rodriguez, J., Tolleter, D., Grossman, A. R., Park, M., & Program, B. I. (2015). Symbiodinium transcriptome and global responses of cells to immediate changes in light intensity when grown under autotrophic or mixotrophic conditions, 67–80. <https://doi.org/10.1111/tpj.12789>
- Xie, Y. Y., Lu, Z., Kong, X. Le, Zhou, T., Bansal, S., & Hider, R. (2016). Systematic comparison of the mono-, dimethyl-and trimethyl 3-hydroxy-4(1H)-pyridones- Attempted optimization of the orally active iron chelator, deferiprone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *115*, 132–140.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.014>
- Yoon, J. E., Yoo, K. C., MacDonald, A. M., Yoon, H. Il, Park, K. T., Yang, E. J., ... Kim, I. N. (2018). Reviews and syntheses: Ocean iron fertilization experiments - Past, present, and future looking to a future Korean Iron Fertilization Experiment in the Southern Ocean (KIFES) project. *Biogeosciences*, *15*(19), 5847–5889.
<https://doi.org/10.5194/bg-15-5847-2018>
- Zhou, T., Ma, Y., Kong, X., & Hider, R. C. (2012). Design of iron chelators with therapeutic application. *Dalton Transactions*, *41*(21), 6335–6349.
<https://doi.org/10.1039/c2dt12247b>

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

- Nome: Jose Miguel Diaz Romero
- Local e data de nascimento: Lima/Peru – 24/071989

2. EDUCAÇÃO

- Centro Educativo Parroquial Nuestra Señora de la Luz (CEP - NSL), Lima (2006)
- Bachiller em Química, Facultad de Química e Ingeniería Química - Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, 2017
- Mestrando em Química, Instituto de Química - Universidade de São Paulo (IQ - USP), (2020)

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Curso de Excel nível básico, intermediário e avançado – CEPS UNI – Universidad Nacional de Ingeniería (2017 – 2018)
- Criação e manejo de base de dados – Facultad de Química e Ingeniería Química - UNMSM (2015)
- Seminário teórico-prático de métodos computacionais específicos utilizando funcionais DFT (M05, M05-2X, M06) para o estudo de espécies orgânicas e organometálicas – Universidad Nacional de Ingeniería (2015)
- Capacitação de manejo de programas computacionais aplicados à química: Hyperchem, Gaussian 09, Spartan 14 – Facultad de Química e Ingeniería Química (UNMSM) - 2015
- Alfaiataria Básica – Instituto INTEFOR (2010)
- Produção Escrita: essay nível B1 - Idiomas sem Fronteiras 32 horas (2018)
- Produção IELTS: Produção Oral nível B1 - Idiomas sem Fronteiras :16 horas (2018)
- TOEFL ITP: Preparatório – Idiomas sem Fronteiras - 32 horas (2019)

4. OCUPAÇÃO

- Assistente de laboratório de Química Geral (UNMSM-FQIQ): entrega de materiais de laboratório e preparação de reagentes – 2012
- Assistente de oficina- TEBCSAR – 2015
- Estágio Docência – Laboratório de Química Quântica Computacional - - FQIQ – UNMSM – Aldo Javier Guzmán Duxtán (supervisor), Juan Ladislao Arroyo Cuyubamba (docente principal do curso) - 2015

- Assistente de laboratório Química cuántica y nuevos materiales para la innovación tecnológica (QCNMIT)- UNMSM – 2015, 2016 e 2017
- Docente de química – Colégio Particular Clemente Althaus - 2017
- Docente de química – Colégio Particular Leoncio Prado – 2017
- Estagiário - Consultoria na revisão e classificação de Itens tarifários, de acordo com suas restrições - Merck Perú– 2016 e 2017
- Mestrando em pesquisa em Química, Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos (LAQBAM), Instituto de Química – USP: 2018 – 2020.

Estágio Docência

- **Nome da disciplina da Graduação:** QFL 1444-Físico-Química Experimental
Professor da disciplina/Supervisor: Atualpa Albert Carmo Braga (Supervisor)- Rômulo Augusto Ando
Atividades exercidas: Monitor de laboratório
Horas dedicadas: 5 horas semanais
- **Nome da disciplina da Graduação:** QFL 1101-Química Geral
Professor da disciplina/Supervisor:
 - Hermi Felinto de Brito (Teoria)
 - Flavio Maron Vichi (Experimental)
 - Renato Sanches Freire (Experimental)
 - Liane Marcia Rossi (Experimental)**Atividades exercidas:** Monitor de teoria e laboratório
Horas dedicadas: 6 horas semanais

Participação em eventos científicos

- Workshop Meet the Editors “Scientific Writing” IFUSP, Auditorium Adma Jafet, São Paulo/SP, Brazil - Outubro 1-2, 2018 – Ouvinte
- “8th Congress of the International BioIron Society” - EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Alemanha - Maio 5 – 10, 2019 - Apresentação de pôster – “Effect of the chemical speciation of iron on the growth of *Symbiodinium sp.* (dinophyceae)”
- International Conference on Environmental Bioinorganic and Toxicology Research CEBITOR 2019 - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Institu-

to de Química – Universidade de São Paulo (USP) - : Dezembro 10 – 11, 2019 – Ouvinte

- International Conference on Environmental Bioinorganic and Toxicology Research CEBITOR 2019 - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e Instituto de Química – Universidade de São Paulo (USP) - Dezembro 10 – 11, 2019 - Apresentação de pôster – “Effect of the chemical speciation of synthetic iron complexes and thermal stress on the growth of *Symbiodinium* sp,”
- BIOMET 2019 ; Pathways of environmental remediation: devices, prototypes, sensors and bioindicators - Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) -Lima - Perú - Dezembro 19, 2019 - Ouvinte
- BIOMET 2019 ; Pathways of environmental remediation: devices, prototypes, sensors and bioindicators - Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) -Lima – Perú - Dezembro 19, 2019 - Palestrante – “Efecto de la especiación química de complejos sintéticos de hierro(III) y estrés térmico en el crecimiento de *Symbiodinium* sp”
- “I WORKSHOP IN BIOORGANIC CHEMISTRY AND DRUG DISCOVERY”(WBCDD) - Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) -Lima – Perú - Dezembro 20, 2019 - Ouvinte

Artigos completos publicados em periódicos

- Chavez Serrano, J., Díaz, J. & Valentín, R. (2018). Estudio DFT de las Propiedades Electrónicas y Reactividad Química en el Cluster de Cobre Hexaquis (μ_2 -Benzoato-O,O’)-hexa-cobre(I). *TECNIA*, 28(1). <https://doi.org/10.21754/tecnia.v28i1.185>