

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

RENAN CASTELHANO GEBARA

**EFEITOS ISOLADOS E COMBINADOS DOS METAIS
ZINCO E ALUMÍNIO SOBRE REPRESENTANTES DE
TRÊS NÍVEIS TRÓFICOS DE ORGANISMOS
AQUÁTICOS DULCÍCOLAS**

SÃO CARLOS - SP
2022

RENAN CASTELHANO GEBARA

EFEITOS ISOLADOS E COMBINADOS DOS METAIS ZINCO E ALUMÍNIO SOBRE
REPRESENTANTES DE TRÊS NÍVEIS TRÓFICOS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS
DULCÍCOLAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof.^a Titular Dr.^a Maria da Graça Gama Melão

Coorientadora: Dr.^a Giseli Swerts Rocha

SÃO CARLOS - SP
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Renan Castelhana Gebara, realizada em 11/04/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão (UFSCar)

Profa. Dra. Odete Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda Cristina Massaro (BIOTOX)

Profa. Dra. Renata Fracácio Francisco (UNESP)

Profa. Dra. Denise Tieme Okumura (BIOTOX)

Dedico esta tese a todos os professores que tive ao longo da minha vida, os quais além de ensinar os conteúdos formais, também me inspiraram a ser um ser humano melhor, sempre procurando questionar a realidade à minha volta. Ser professor é o ofício de preparar cidadãos para o futuro e, sem eles, não há futuro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todos os caminhos que me foram abertos e por tornar possíveis os meus sonhos.

À Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Gama Melão pela orientação e por todo apoio e dedicação desde a minha Iniciação Científica, em 2013, e por ter acreditado no meu potencial desde o início. Agradeço pela educação, incentivo, paciência e pelos ensinamentos, que contribuíram tanto para meu crescimento profissional quanto pessoal.

À Dr.^a Giseli Swerts Rocha pela coorientação, por todos os conselhos, todas as horas de dedicação no laboratório, pela paciência, incentivo e por todos os ensinamentos a mim investidos, permitindo que me aperfeiçoasse enquanto profissional e enquanto pessoa.

Às Prof.^a Dr.^a Odete Rocha, Prof.^a Dr.^a Renata Fracácio Francisco, Dr.^a Fernanda Cristina Massaro e Dr.^a Denise Tieme Okumura, por aceitarem participar como membros titulares da banca examinadora desta Tese.

Ao Prof. Dr. Hugo Sarmento e à Prof.^a Dr.^a Suzelei Rodgher, por aceitarem participar como membros suplentes da banca examinadora desta Tese.

À Dr.^a Liane Biehl Printes, minha primeira orientadora em projetos de extensão, agradeço por toda ajuda, paciência e dedicação, me ensinando os primeiros passos da carreira científica.

À Prof.^a Dr.^a Odete Rocha, sempre simpática e com disponibilidade em ajudar e ensinar. Agradeço por todo apoio e por todos os ensinamentos durante conversas e durante disciplinas do PPGERN.

Ao Prof. Dr. Hugo Sarmento por toda paciência e ajuda com as análises de citometria de fluxo, bem como por toda a ajuda e apoio desde minha Iniciação Científica. Agradeço também pela utilização do citômetro de fluxo no Laboratório de Biodiversidade e Processos Microbianos, chefiado por ele.

À Prof.^a Dr.^a Ana Teresa Lombardi, pela utilização do fluorômetro de pulso de amplitude modulada no Laboratório de Biotecnologia de Algas.

À Dr.^a Lays de Oliveira Gonçalves Alho e à MSc. Cíntia Bruno de Abreu, pela amizade e ajuda imprescindível durante as etapas experimentais de meu trabalho.

À Dr.^a Adrislaine da Silva Mansano, por toda a ajuda, paciência, pelas sábias palavras em momentos de adversidade e por todo apoio para a realização dos experimentos. Sua vasta contribuição foi de extrema importância para a realização deste trabalho.

À Dr.^a Raquel Aparecida Moreira por todo o apoio, ensinamentos e ajuda sobre os experimentos. Seus conhecimentos foram de extrema importância tanto para a realização dos

experimentos, bem como para a análise das misturas.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – *campus* sede, pela infraestrutura e suporte para realização de meu doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN/UFSCar), incluindo os docentes, representantes discentes, funcionários do corpo administrativo e aos integrantes da Coordenação de Pós-Graduação (CPG).

Ao Departamento de Hidrobiologia (DHB/UFSCar), seus técnicos administrativos e funcionários terceirizados da limpeza, por todo o suporte e auxílio.

Ao Departamento de Física (DF/UFSCar), em especial ao técnico Cláudio, por todo o apoio com relação aos serviços de criogenia.

Ao Dr. Marc Suter do Department of Environmental Systems Science - Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETHZ) e Department of Environmental Toxicology - Eawag, pela supervisão, infraestrutura para realização dos experimentos, atenção, disponibilidade e recepção durante meu estágio de doutorado sanduíche na Suíça. Agradeço também aos professores, pesquisadores e técnicos administrativos por toda a ajuda e ensinamentos, especialmente: Severin, Kristin, Jenny, Colette, Aduccia, René, Pascal, Sarah, Gaya, Olga e Franziska.

Aos professores da Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETHZ), pelos valiosos conhecimentos ministrados durante a disciplina Advanced Ecotoxicology.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À CAPES, pela bolsa concedida no Brasil, processo n.º 88882.426388/2019-01.

À CAPES, pela bolsa de doutorado sanduíche (CAPES-PrInt) concedida no exterior, processo n.º 88887.369178/2019-00.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido através dos processos 2014/14139-3, 2016/00753-7 e 2018/07988-5.

À minha família, por todo apoio, suporte e incentivo aos estudos. Sem eles nada seria possível.

Aos meus amigos e colegas que tornaram minha estadia em São Carlos mais alegre, citados em ordem alfabética: Cíntia, Erika, Giseli, Helena, Julia, Karime, Laine, Larissa, Lays, Lucas, Mari, Mika, Paulinha, Roberta e Vinicius.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Efeitos isolados e combinados dos metais zinco e alumínio sobre representantes de três níveis tróficos de organismos aquáticos dulcícolas

RESUMO

Os metais estão amplamente distribuídos pela biosfera, porém o aumento de suas concentrações em ecossistemas aquáticos causa preocupação. Embora as legislações ambientais utilizem a toxicidade dos metais isolados em normativas acerca de concentrações máximas permitidas no ambiente, sabe-se que os metais coocorrem nos ecossistemas e, desta forma, estudos de toxicidade de misturas metálicas são de extrema relevância. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos isolados e em misturas dos metais zinco e alumínio sobre a microalga verde *Raphidocelis subcapitata* e sobre o cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*, bem como avaliar os efeitos de Zn sobre estágios iniciais de *zebrafish* (*Danio rerio*). Os resultados indicam que ambos os metais inibiram o crescimento de *R. subcapitata*, com CI50-96h: 0,026 mg Zn L⁻¹ e 0,74 mg Al L⁻¹. Quanto aos parâmetros fotossintéticos, houve queda da eficiência do complexo de evolução O₂ (F₀/F_v) e da eficiência do fotossistema II (Φ_M), bem como aumento de *quenchings* não-fotoquímicos. Analisando crescimento de *R. subcapitata* após 96 h, misturas de Zn e Al causaram efeitos sinérgicos em concentrações baixas e antagônicos em concentrações altas. Analisando-se F₀/F_v e Φ_M, observa-se antagonismo em altas concentrações de Al. Por meio de curva de distribuição de espécies (SSD), calculamos as concentrações perigosas a 5% das espécies, HC5: 0,062 mg Zn L⁻¹ e 0,15 mg Al L⁻¹; segundo dados da curva SSD, *R. subcapitata* foi organismo mais sensível ao Zn e um dos mais sensíveis ao Al. Para o cladóceros *C. silvestrii*, observamos imobilidade em testes de toxicidade aguda, CE50-48: 0,22 mg Zn L⁻¹ e 0,52 mg Al L⁻¹; e redução na reprodução em testes de toxicidade crônicos, com CE50-7d: 0,11 mg Zn L⁻¹ e 0,37 mg Al L⁻¹. Em misturas de Zn e Al sobre *C. silvestrii*, observamos sinergismo em relação aos efeitos sobre a mobilidade. Análises de risco preliminar (AR) com *C. silvestrii* demonstram que há maior risco ecológico em misturas do que os metais individualmente. Para o peixe-zebra, obtivemos CL50-96h: 24,18 mg Zn L⁻¹; observou-se também que Zn alterou a incorporação de alguns elementos essenciais, bem como causou alterações comportamentais. Em AR de Zn, analisando-se 3 níveis tróficos, constatamos risco ecológico alto para *R. subcapitata* e *C. silvestrii*, e risco moderado para *zebrafish*. Portanto, levando-se em conta os dados de misturas, podemos inferir que a toxicidade de misturas é, muitas vezes, imprevisível, de modo que as respostas nem sempre são aditivas. Dessa forma, espera-se que este estudo enfatize a importância da inclusão de testes ecotoxicológicos de misturas nas análises de risco.

Palavras-chave: análise de risco, alga, Ecotoxicologia aquática, microcrustáceo, peixe.

Individual and combined effects of the metals zinc and aluminum on representative freshwater organisms of three trophic levels

ABSTRACT

Metals are widely distributed throughout the Biosphere, and the increase in their concentration in aquatic ecosystems may cause concern. Although environmental legislation utilizes the isolated metal toxicity in normative about maximum allowed concentrations in the environment, it is known that the metals cooccur; therefore, studies dealing with the toxicity of metals' mixtures are of great importance. The aim of our study is to analyze the individual and combined effects of mixtures of zinc (Zn) and aluminum (Al) on the green microalga *Raphidocelis subcapitata* and on the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* and, besides that, we also evaluated the isolated effects of Zn on initial stages of zebrafish (*Danio rerio*). Results indicate that both metals inhibited the growth of *R. subcapitata*, with IC50-96h: 0.026 mg Zn L⁻¹ and 0.74 mg Al L⁻¹. Regarding the photosynthetic parameters, we observed decay in the efficiency of O₂ evolving-complex (F₀/F_v) and efficiency of photosystem II (PSII) and the increase of non-photochemical quenchings. Analyzing the growth of *R. subcapitata* after 96 h, Zn and Al mixtures exerted synergic effects at low concentrations and antagonistic effects at high concentrations. Observing F₀/F_v e Φ_M, we found antagonistic effects at high Al concentrations. By plotting species sensitivity distributions (SSD), the hazard concentrations to 5% of the species were calculated, HC5: 0.062 mg Zn L⁻¹ and 0.15 mg Al L⁻¹; according to SSD, *R. subcapitata* was the most sensitive organism to Zn, and it was one of the most sensitive to Al. Regarding the cladoceran *C. silvestrii*, we observed immobility on acute toxicity tests, 48 h-EC50: 0.22 mg Zn L⁻¹ and 0.52 mg Al L⁻¹; and reduction on the reproduction during chronic toxicity tests, 7d-EC50: 0.11 mg Zn L⁻¹ and 0.37 mg Al L⁻¹. Mixtures of Zn and Al on *C. silvestrii* exert synergism to mobility. Preliminary risk assessments (RA) of *C. silvestrii* show a higher ecological risk of metal mixtures than the isolated metals' effects. To zebrafish, we obtained 96h-LC50: 24.18 mg Zn L⁻¹; we also observed that Zn altered the uptake of some essential elements, and altered behavior of zebrafish. Analyzing the RA of Zn on organisms from 3 trophic levels, Zn exerts high ecological risk to *R. subcapitata* and *C. silvestrii*, and moderate risk to zebrafish. Therefore, observing mixture data, we can infer that the toxicity of mixtures is often unpredictable since the responses are not always additive. Thus, based on results from this study we reinforce the importance of including ecotoxicological tests of mixtures in risk assessments.

Keyword: Aquatic Ecotoxicology, alga, microcrustacean, mixture, fish, risk assessment.

LISTA DE FIGURAS

Introdução geral e justificativa

Figura 1. Isoblograma representando a interação das substâncias-teste 1 e 2. A linha (1) indica aditividade, a curva côncava (2) indica sinergismo e a curva convexa (3) indica antagonismo. Imagem adaptada de BELL (2005) 32

Capítulo 1 - Misturas de zinco e alumínio exercem efeitos sinérgicos sobre a alga *Raphidocelis subcapitata* em concentrações ambientalmente relevantes

Figure 1. Full factorial design of the toxicity test with isolated and combined zinc and aluminum. Treatments T1 to T8 refer to isolated compounds, while T9 to T24 refer to mixture of metals, where C = control group 50

Figure 2. Specific growth rate (day^{-1}), cell size (FSC-H), cellular complexity (SSC-H) and chlorophyll *a* fluorescence (FL3-H) of *Raphidocelis subcapitata* exposed to zinc (A, B) and aluminum (C, D) during 96h. Metals' concentrations are expressed in μM . Asterisks represent significant differences from control group ($p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Dunnett's post-hoc test; except the SSC-H parameter (A1 treatments), analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's post-hoc test)..... 55

Figure 3. Cellular reactive oxygen species (ROS) produced by *Raphidocelis subcapitata* exposed to zinc (A) and aluminum (B) during 5 and 96 h. Metal concentrations are expressed in μM . Asterisks represent significant differences from the control group ($p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Dunnett's post-hoc test) 57

Figure 4. Species sensitivity distribution (SSD) based on EC_{50} values (mg metal L^{-1}) of aquatic organisms, obtained from scientific literature (Tables S2 and S3, Supplementary material), exposed to zinc (A) and aluminum (B). Data of the present study (*Raphidocelis subcapitata*) are in bold 59

Figure 5. Isobolograms of specific growth rates of *Raphidocelis subcapitata* exposed to zinc and aluminum mixtures, following the concentration addition (A) and independent action (B) models, both from dose level-dependence (DL) deviation. Linear lines demonstrate no interaction, while concave and convex shapes represent, respectively, synergism and antagonism (Alloatti et al., 2013) 62

Figure S1. Zinc and aluminum determination by ICP-OES. Quantification was grouped by

treatments with same nominal metal concentration. For zinc (A): sample 1 = T1, T9, T10, T11 and T12; 2 = T2, T13, T14, T15, T16; 3 = T3, T17, T18, T19, T20; 4 = T4, T21, T22, T23, T24. For aluminum (B): sample 1 = T5, T9, T13, T17, T21; 2 = T6, T10, T14, T18, T22; 3 = T7, T11, T15, T19, T23; 4 = T8, T12, T16, T20, T24. Treatments' acronyms are available in the manuscript (Fig. 1) 71

Capítulo 2 - Efeitos isolados e combinados de zinco e alumínio sobre o fotossistema II de uma microalga de água doce obtidos através de fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM)

Figura 1. Parâmetros fotossintéticos, em valores relativos (V_r), da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Zn e Al por 72h. Para a variável eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_v), quanto menor o valor, maior a eficiência (painéis A-B); eficiência máxima (Φ_M) do fotossistema II (FSII), quanto maior o valor, maior a eficiência (painéis C-D). Asteriscos representam diferença significativa para dados normais (*One-way* ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0.05$) e não-normais (Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p < 0,05$). Painéis A (0 h) e C (72 h) são os que contêm dados não-normais 92

Figura 2. Parâmetros fotossintéticos, em valores relativos (V_r), da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Zn e Al por 72h. Eficiência efetiva (Φ'_M) do FS II em 72 h (painéis A-B); Quenchings fotoquímico (qP) e não-fotoquímicos (qN, NPQ, Y(NPQ) e Y(NO)) em 72 h (painéis C-D). Asteriscos representam diferença significativa para dados normais (*One-way* ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$) 93

Figura 3. Valores relativos (%) da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Zn (A) e Al (B) por 72h. Asteriscos representam diferença significativa para dados normais (*One-way* ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$).. 96

Figura 4. Efeitos combinados de Zn (μM) e Al (μM) sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta por 72 h. As variáveis apresentadas são taxa específica de crescimento (μ , painel A), fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*, painel B), eficiência máxima do fotossistema II (Φ_M , painel C), eficiência do complexo de evolução do O_2 (F_0/F_v , painel D) e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs, painel E). A legenda de 0,2-1,4 refere à uma taxa entre efeito previsto vs efeito observado nas misturas, onde: valores < 1 indicam antagonismo; valores > 1 indicam sinergismo; e valores próximos a 1 indicam aditividade 100

Figura S1. Desenho *full factorial* de testes ecotoxicológicos de *Raphidocelis subcapitata* exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h. A cor dos círculos plotados

correspondem a: grupo controle (cinza), tratamento dos metais isolados (branco) e metais em misturas (preto). As concentrações de ambos metais estão em μM 110

Figura S2. Relações entre os multiparâmetros da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta por 72 h isoladamente aos metais zinco (painéis à esquerda – A, C, E, G, I) e alumínio (painéis à direita – B, D, F, H, J). Onde: EROs: espécies reativas de oxigênio; F_0/F_V = eficiência do complexo de evolução do O_2 ; Φ_M : eficiência máxima do fotossistema II; V_r : valores relativos 111

Capítulo 3 - Toxicidade e análise de risco de misturas de zinco e alumínio para *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera)

Figure 1. Full factorial design, representing *Ceriodaphnia silvestrii* in tests with isolated and combined zinc and aluminum, during acute tests (48h) (A) and ingestion rates test (B)..... 124

Figure 2. Immobilization (%) of *Ceriodaphnia silvestrii* in single zinc (A) and aluminum (B) experiments (mg metal L^{-1}), after 48 h. Bars correspond to mean \pm standard deviation. Differences from control (one-way ANOVA, Dunnett's test, $p < 0.05$) are marked with asterisks 127

Figure 3. *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to zinc (A to D) and aluminum (E to H) during 7-d chronic experiments. Columns and bars represent mean values and standard deviation, respectively. Differences from control are marked with asterisks (B= one-way ANOVA, Dunnett's test, $p < 0.05$; A, D, E, F and H = Kruskal-Wallis, Dunn's test, $p < 0.05$)..... 130

Figure 4. Ingestion rates ($\text{mL ind}^{-1} \text{h}^{-1}$) of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to zinc (A) and aluminum (B) for 24 h. Differences from the control are marked with asterisks (one-way ANOVA, Dunnett's test, $p < 0.05$)..... 132

Figure 5. Mixture experiments of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to zinc and aluminum during 48 h immobility toxicity tests. The isobologram of A represents the independent action model (IA), with synergistic deviation (S/A). The additivity line is represented by the thick dashed line, crossing the EC50 of both metals during single exposure. The concave shapes, below the additivity lines, represent synergism. The numbers along the shapes represent the modelled immobilization ratios of *C. silvestrii* by the deviation models..... 135

Figure S1. Calibration curve of zinc (A) and aluminum (B) obtained flame atomic absorption spectrometry (PerkinElmer PinAAcle 900 T, USA). Zn was quantified using 213.86 nm absorption lines, 0.7 nm slit width, with flame stoichiometry of 10.0 L min^{-1} of synthetic air

and 2.5 L min⁻¹ of acetylene; while Al was quantified using 309.27 nm absorption lines, 0.7 nm slit width, with flame stoichiometry of 6.0 L min⁻¹ of nitrous oxide and 7.5 L min⁻¹ of acetylene 146

Capítulo 4 - Toxicidade de zinco sobre estágios iniciais de *Danio rerio*: efeitos sobre mortalidade, incorporação de elementos essenciais, comportamento de natação e análise de risco ecológico

Figura 1. Medições (valor médio ± desvio-padrão) das concentrações de zinco (mg Zn L⁻¹) por ICP-MS nas soluções-teste (1 a 6) e na solução-estoque (7). Quanto às soluções-teste, analisou-se as concentrações nos frascos durante as diluições nas placas multiposos, onde os testes de toxicidade ocorreram 179

Figura 2. Sobrevivência (%) de *Danio rerio* exposto ao zinco (mg L⁻¹) ao longo de 120 h. Valores apresentados correspondem à média ± desvio-padrão. Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA *one-way*, e *post hoc* teste de Dunnett)..... 181

Figura 3. Curvas logísticas de sobrevivência (%) de *Danio rerio* (mg L⁻¹) em exposição ao zinco, após 96 h (A) e 120 h (B). Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA *one-way*, e *post hoc* teste de Dunnett) .. 182

Figura 4. Correlações entre incorporação de zinco (Zn)-A, sódio (Na)-B, cálcio (Ca)-C, potássio (K)-D, cobre (Cu)-E e magnésio (Mg)-F por estágios iniciais de *Danio rerio* (*zebrafish*) em exposição ao Zn por 120 h. Os valores de incorporação estão expressos como: ng /mg PF de *D. rerio* (zf), onde PF = peso fresco. Os valores foram aferidos por ICP-MS. Por favor, note que as escalas dos eixos y são diferentes 183

Figura 5. Análise de natação espontânea de larvas de *Danio rerio* após exposição de 120 h a concentrações de 0; 0,002; 0,047 e 1,12 mg Zn L⁻¹. Analisou-se a distância percorrida de movimentos espontâneos a cada 30s (A), e após estímulo (C); bem como velocidade de natação de movimentos espontâneos a cada 30s (C), e após estímulo (D). Asteriscos representam diferença significativa entre o tratamento e o grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA *one-way*, e *post hoc* teste de Dunnett – painéis A, B e D; $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, e *post hoc* teste de Dunn – painel C)..... 186

Figura S1. Curvas de calibração dos compostos zinco (Zn)-A, sódio (Na)-B, cálcio (Ca)-C, potássio (K)-D, cobre (Cu)-E e magnésio (Mg)-F. As análises foram realizadas por meio de por meio de espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) em

equipamento 8900 Triple Quadrupole ICP-MS (Agilent). Cps = *counts per second* (contagem por segundo) 193

Figura S2. Medição por ICP-MS da incorporação de zinco (Zn), sódio (Na), cálcio (Ca), potássio (K), cobre (Cu) e magnésio (Mg) por estágios iniciais de *Danio rerio*, após 120 h de exposição a concentrações de Zn. Os dados estão representados por ng Zn/indivíduo (em preto) e por ng metal/ mg peso fresco de *D. rerio* (cinza). Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA *one-way*, e *post hoc* teste de Dunnett para painéis A, B(PF), E); ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, e *post hoc* teste de Dunn para painéis B(ind.⁻¹), C, D, F) 194

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - Misturas de zinco e alumínio exercem efeitos sinérgicos sobre a alga *Raphidocelis subcapitata* em concentrações ambientalmente relevantes

Table 1. NOEC (no observed effect concentration), LOEC (lowest observed effect concentration) and Inhibition concentration (96h IC50) based on specific growth rates of *Raphidocelis subcapitata* exposed to zinc and aluminum. IC50 are presented by values and standard deviation..... 54

Table 2. Summary of modeled data of specific growth rates of *Raphidocelis subcapitata* exposed to mixtures of zinc (Zn) and aluminum (Al) during 96 h. Values were obtained by the MIXTOX tool (Jonker et al., 2005). Max = maximum response value, β = slope response of isolated compounds, IC50 = median growth inhibition concentration; a and $b_{DR/DL}$ = function parameters; SS = sum of the squared residuals; r^2 = regression coefficient; χ^2 or F test = statistical test; df = degrees of freedom; p (χ^2/F) = level of significance of statistical test; CA = concentration addition model; IA = independent action model; S/A = synergism/antagonism deviation; DR = dose ratio-dependent deviation; DL = dose level-dependent deviation..... 61

Table S1. Zinc (Zn) and aluminum (Al) speciation in test solutions, predicted by the MINEQL⁺ software 72

Table S2. Toxicity data of aquatic organisms exposed to zinc (datum of the present study is in bold), obtained from scientific studies 73

Table S3. Toxicity data of aquatic organisms exposed to aluminum (datum of the present study is in bold), obtained from scientific studies..... 74

Capítulo 2 - Efeitos isolados e combinados de zinco e alumínio sobre o fotossistema II de uma microalga de água doce obtidos através de fluorimetria de pulso de amplitude modulada (PAM)

Tabela 1. Equações para cálculo dos quenchings fotoquímico e não fotoquímicos..... 86

Tabela 2. Taxa específica de crescimento (μ) e fluorescência da clorofila *a* (f-Chl *a*) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta aos metais Zn e Al por 72 h. Os valores estão apresentados como média \pm desvio-padrão, de modo que os asteriscos representam diferença

estatística entre os tratamentos e o grupo controle (<i>One-way</i> ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$).....	89
Tabela S1. Taxa específica de crescimento - μ (média \pm desvio padrão) de <i>Raphidocelis subcapitata</i> exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h	112
Tabela S2. Fluorescência da clorofila <i>a</i> - Chl <i>a</i> (média \pm desvio padrão) de <i>Raphidocelis subcapitata</i> exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h	113
Tabela S3. Eficiência quântica máxima do fotossistema II - Φ_M (média \pm desvio padrão) de <i>Raphidocelis subcapitata</i> exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h.....	114
Tabela S4. Eficiência do complexo de evolução do oxigênio - F_0/F_V (média \pm desvio padrão) de <i>Raphidocelis subcapitata</i> exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h.....	115
Tabela S5. Espécies reativas de oxigênio - EROs (média \pm desvio padrão) de <i>Raphidocelis subcapitata</i> exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h	116

Capítulo 3 - Toxicidade e análise de risco de misturas de zinco e alumínio para *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera)

Table 1. Effective concentration (EC50) values (mg metal L ⁻¹) for <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> exposed to zinc (Zn) and aluminum (Al) after 48 h. The EC50 values correspond to values \pm standard error (95% confidence intervals), calculated from three parameter logistic curves	128
Table 2. Summary of MIXTOX analysis of <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> exposed (48 h) to zinc (Zn) and aluminum (Al) mixtures, with fit tests of the independent action model (IA). Bold represents data from the best deviation (lower p value, followed by lower residuals). Data are interpreted according to Jonker (2005). Please see Table S9, supporting information, for more details.....	133
Table 3. Assessment of ingestion rates (mean \pm standard deviation) of <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> in mixtures of zinc (Zn) and aluminum (Al). Results from mixture treatments presented below were statistically different ($p < 0.05$, <i>One-way</i> ANOVA, Tukey test) from control or from single metals exposure. Observed effects higher than predicted effects indicates antagonism (A), while observed effects lower than the predicted effects indicates synergism (S)	136
Table 4. Preliminary risk assessment of <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> in zinc (Zn) and aluminum (Al) experiments, during acute toxicity tests (48 h), where: MEC = measured environmental	

concentrations (calculated in the present study, based on literature data); PNEC = predict no effect concentration; RQ = risk quotient. The assessment factor is 1000. Optimistic and pessimistic scenarios were calculated, respectively, with the lowest and the highest MECs available in literature (Tables S13 and S14, supporting information). For realistic scenario, MEC were set as the median value of the environmental concentrations (Tables S13 and S14, supporting information)..... 138

Table S1. Nominal and measured concentrations of the stock solutions of zinc (A) and aluminum (B), quantified by flame atomic absorption spectrometry (PerkinElmer PinAAcle 900 T, USA) 147

Table S2. Water parameters from acute (48h) and chronic (7-d) toxicity tests of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al..... 148

Table S3. Speciation of zinc (Zn) in test solutions, predicted by MINEQL⁺ 4.6.3.2 software 149

Table S4. Speciation of aluminum (Al) in test solutions, predicted by MINEQL⁺ 4.6.3.2 software 150

Table S5. Speciation of elements of the artificial water, predicted by MINEQL⁺ 4.6.3.2 software 151

Table S6. Water parameters from toxicity tests of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al mixtures (ingestion rates experiments)..... 152

Table S7. Number of neonates of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al, during chronic toxicity tests..... 153

Table S8. Water parameters from acute toxicity tests of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al mixtures (immobility experiments) 154

Table S9. Summary table for interpretation of the parameters substituted in IA (independent action) model, adapted from Jonker (2005). Where S/A = synergism/antagonism; DR = dose ratio dependence; DL = dose level dependence 155

Table S10. Assessment of ingestion rates (mean ± standard deviation) of *Ceriodaphnia silvestrii* in mixtures of zinc (Zn) and aluminum (Al). Results from mixture treatments presented in bold were statistically different (p < 0.05, One-way ANOVA, Tukey test) from control or from single metals exposure. Observed effects higher than predicted effects indicates

antagonism (A), while observed effects lower than the predicted effects indicates synergism (S)
..... 156

Table S11. Statistical analyses of ingestion rates of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to mixtures of Zn and Al. The statistical analyses were assessed to interpret the data of Table 3 (manuscript) and Table S10 157

Table S12. Ingestion rates of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al mixtures 160

Table S13. Measured environmental concentrations (MECs) of zinc (Zn) in Brazilian freshwater ecosystems. Where: Flame-AAS = flame atomic absorption spectrometry; GFAAS = graphite furnace atomic absorption spectrometer; ICP-MS = inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-OES = inductively coupled plasma optical emission..... 161

Table S14. Measured environmental concentrations (MECs) of aluminum (Al) in Brazilian freshwater ecosystems. Where: GFAAS = graphite furnace atomic absorption spectrometer; ICP-MS = inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-OES = inductively coupled plasma optical emission..... 165

Capítulo 4 - Toxicidade de zinco sobre estágios iniciais de *Danio rerio*: efeitos sobre mortalidade, incorporação de elementos essenciais, comportamento de natação e análise de risco ecológico

Tabela 1. Especificação de zinco (Zn) nas soluções-teste, de acordo com predições do software MINEQL⁺ 180

Tabela 2. Concentrações letais (CL_x) de *Danio rerio* exposto ao zinco durante 96 e 120 h. Valores (mg L⁻¹) estão representados como valor ± desvio-padrão (SD). Valores calculados com dados de 3 testes de toxicidade. 182

Tabela 3. Análise de risco ecológico de *Danio rerio*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Raphidocelis subcapitata* expostos ao zinco (Zn)^a 187

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Taxa específica de crescimento
AF	Fator de avaliação
ANOVA	Análise de Variância
CA	Concentração de adição
CE	Concentração efetiva
CEO	Complexo de evolução do oxigênio
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
CI	Concentração inibitória
CL	Concentração letal
DL	Desvio dependente do nível da dose
DR	Desvio dependente da proporção da dose
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F ₀	Fluorescência inicial em adaptação ao escuro
F ₀ /F _V	Eficiência do complexo de evolução do oxigênio
F ₀ '	Fluorescência inicial em adaptação à luz
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
f-Chl <i>a</i>	Fluorescência da clorofila <i>a</i>
F _M	Fluorescência máxima em adaptação ao escuro
F _M '	Fluorescência máxima em adaptação à luz
F _S	Fluorescência em estado variável
FSII	Fotossistema II
F _V	Fluorescência de estado estável
GSH	Glutathiona
HC	Concentração perigosa
Hpf	Horas pós-fertilização
IA	Ação independente
ICP-MS	Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente

ICP-OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado
MEC	Concentração ambiental medida
MDA	Malondialdeído
NPQ	<i>Quenching</i> não fotoquímico
PAM	Pulso de amplitude modulada
Φ_M	Eficiência máxima do fotossistema II
Φ_M'	Eficiência efetiva do fotossistema II
PNEC	Concentração sem efeito previsto
Q _A	Plastoquinona <i>a</i>
q _N	<i>Quenching</i> não fotoquímico
q _P	<i>Quenching</i> fotoquímico
RQ	Quociente de risco
S/A	Sinergismo/antagonismo
SOD	Superóxido dismutase
SSD	Distribuição de sensibilidade das espécies
Y(NO)	<i>Quenching</i> não fotoquímico
Y(NPQ)	<i>Quenching</i> não fotoquímico
Zfe	Embriões de <i>zebrafish</i>

LISTA DE ABREVIATURAS EM INGLÊS

AF	Assessment factor
ANOVA	Analysis of variance
CA	Concentration addition model
CCC	Criterion continuous concentration
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
DL	Dose level-dependent
DOC	Dissolved organic carbon
DR	Dose ratio-dependent deviation
EC	Efective concentration
FAAS	Flame atomic absorption spectrometry
FL1-H	Green fluorescence detection
FL3-H	Chlorophyll <i>a</i> fluorescence
FSC-H	Cell size
HC	Hazardous concentration
IA	Independent action model
IC	Inhibitory concentration
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
LC	Lethal concentration
LOEC	Lowest observed effect concentration
MEC	Measured environmental concentration
NOEC	No observed effect concentration
PNEC	Predicted no effect concentration
<i>r</i>	Intrinsic rate of population increase
ROS	Reactive oxygen species
RQ	Risk quotient
S/A	Synergism/Antagonism deviation
SS	Residuals

SSC-H

Cellular complexity

SSD

Species sensitivity distribution

SUMÁRIO

Estrutura da tese.....	25
1. Introdução geral e justificativa	27
1.1. Metais: aplicações e meio ambiente.....	27
1.2. Substâncias-teste	28
1.2.1 Zinco.....	28
1.2.2 Alumínio.....	29
1.3. Misturas	30
1.4. Justificativa.....	32
Referências bibliográficas	35
2. Objetivos.....	43
2.1. Objetivo geral.....	43
2.2. Objetivos específicos.....	43
2.3. Hipóteses	44
Capítulo 1 - Misturas de zinco e alumínio exercem efeitos sinérgicos sobre a alga <i>Raphidocelis subcapitata</i> em concentrações ambientalmente relevantes	
Abstract.....	46
1. Introduction.....	47
2. Material and methods.....	50
2.1. Algae cultures and toxicity tests.....	50
2.2. Cytometer analysis	51
2.3. Metal determination	51
2.4. Data analysis.....	52
3. Results and discussion	53
3.1. Single compounds toxicity	53
3.2. SSD analysis.....	58
3.3. Mixture toxicity.....	60
4. Conclusions.....	63
References	64

Supplementary material	71
------------------------------	----

Capítulo 2 - Efeitos isolados e combinados de zinco e alumínio sobre o fotossistema II de uma microalga de água doce obtidos através de fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM)

Resumo	78
1. Introdução	80
2. Material e métodos.....	84
2.1. Culturas algais e componentes químicos.....	84
2.2. Testes de toxicidade	84
2.3. Phyto-PAM.....	85
2.4. Citometria de fluxo.....	86
2.5. Misturas: análise das interações	87
2.6. Análise estatística	87
3. Resultados e discussão	88
3.1. Efeitos isolados.....	88
3.1.1 Citometria de fluxo: inibição de crescimento e fluorescência da clorofila <i>a</i>	88
3.1.2 Parâmetros fotossintéticos.....	90
3.1.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	94
3.1.4 Análise dos múltiplos <i>endpoints</i>	96
3.2. Efeitos combinados	98
Conclusão	102
Referências	104
Materiais suplementares	110

Capítulo 3 - Toxicidade e análise de risco de misturas de zinco e alumínio para *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera)

Abstract.....	118
1. Introduction.....	119
2. Material and methods.....	121
2.1. Test organisms and chemicals.....	121

2.2. Single toxicity tests	122
2.3. Mixture toxicity tests.....	123
2.4. Preliminary risk assessment	125
2.5. ECx calculation and statistical analyses	126
3. Results and discussion	126
3.1. Single effects	126
3.1.1 Mobility toxicity tests.....	126
3.1.2 Chronic toxicity tests and ingestion rates.....	129
3.2. Combined effects.....	133
3.2.1 Mobility toxicity test	133
3.2.2 Ingestion rates.....	135
3.3. Preliminary risk assessment	137
4. Conclusions.....	139
References	140
Supporting information	146

Capítulo 4 - Toxicidade de zinco sobre estágios iniciais de *Danio rerio*: efeitos sobre mortalidade, incorporação de elementos essenciais, comportamento de natação e análise de risco ecológico

Resumo	169
1. Introdução	170
2. Material e métodos.....	172
2.1. Especificação dos metais	172
2.2. Cultivo de <i>zebrafish</i>	172
2.3. Testes de toxicidade	173
2.3.1 Testes de sobrevivência.....	173
2.3.2 Análises por ICP-MS: testes de incorporação e determinação metálica	174
2.3.3 Testes comportamentais	176
2.4. Análise de risco ecológico.....	177
2.5. Análise dos dados.....	178
3. Resultados e discussão	178
3.1. Quantificação de zinco nas soluções-teste e solução-estoque.....	178

3.2. Testes de sobrevivência.....	180
3.3. Incorporação dos elementos	182
3.4. Testes comportamentais	185
3.5. Análise de risco ecológico.....	186
4. Conclusões.....	187
Referências	188
Material suplementar	193
Conclusões finais.....	195
Considerações finais.....	197

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está estruturada inicialmente com uma introdução geral e justificativa, seguida de objetivos e hipóteses. A tese possui 4 capítulos escritos no formato de artigos científicos, de modo a otimizar a publicação dos artigos e difundir os resultados obtidos com celeridade. Cada capítulo possui os seguintes itens: resumo, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, referências bibliográficas e materiais suplementares. Os artigos estão redigidos de acordo com normas editoriais dos periódicos especializados aos quais os artigos foram/serão submetidos.

Os artigos referentes aos Capítulos 1 e 3 já foram publicados em periódicos e, desta forma, a versão apresentada nesta tese é a versão aceita para publicação (obedecendo às políticas de *copyrights* dos periódicos). Apresentamos resumidamente os objetivos de cada capítulo a seguir.

Capítulo 1 - Misturas de zinco e alumínio exercem efeitos sinérgicos sobre a alga *Raphidocelis subcapitata* em concentrações ambientalmente relevantes: neste capítulo, avaliamos a toxicidade de misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) para a clorofícea *R. subcapitata*, analisando o crescimento populacional. Para os metais isolados, os parâmetros estudados foram crescimento, tamanho e complexidade celular, fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*), produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e curvas de distribuição de sensibilidade de espécies.

Artigo publicado em *Chemosphere*: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125231>

Capítulo 2 - Efeitos isolados e combinados de zinco e alumínio sobre o fotossistema II de uma microalga de água doce obtidos através de fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM): neste estudo, avaliamos misturas de Zn e Al para *R. subcapitata*, a partir de análise de taxa específica de crescimento, parâmetros fotossintéticos (eficiência do complexo de evolução do oxigênio e eficiência máxima do fotossistema II), produção de ERO's e fluorescência da Chl *a*. Para os metais isolados, foram analisados eficiência efetiva do fotossistema II e *quenchings* não fotoquímicos e fotoquímico.

Capítulo 3 - Toxicidade e análise de risco de misturas de zinco e alumínio para *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera): este capítulo teve como objetivo avaliar os

efeitos de Zn e Al, isolados e em mistura, através de análises de testes de imobilidade e análises fisiológicas (taxas de ingestão). Para os metais isolados, avaliamos seus efeitos crônicos sobre a sobrevivência, reprodução, taxa intrínseca de crescimento e idade da primeira reprodução. Além disso, foi realizada uma análise de risco ecológica, levando-se em conta concentrações ambientais dos metais em corpos d'água do Brasil.

Artigo publicado em *Environmental Toxicology and Chemistry*:

<https://doi.org/10.1002/etc.5162>

Capítulo 4 - Toxicidade de zinco sobre estágios iniciais de *Danio rerio*: efeitos sobre mortalidade, incorporação de elementos essenciais, comportamento de natação e análise de risco ecológico: neste estudo, avaliamos os efeitos tóxicos de Zn sobre estágios iniciais de *zebrafish* (*Danio rerio*), por meio dos parâmetros: mortalidade, incorporação, parâmetros comportamentais e análise de risco ecológico. Os dados deste capítulo foram obtidos durante período de doutorado sanduíche na Suíça.

1. INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA

1.1. Metais: aplicações e meio ambiente

Metais são elementos encontrados naturalmente na crosta da Terra (NOUR et al., 2019). Os metais podem ser liberados no meio ambiente por meio de eventos naturais ou por meio de ações antropogênicas, sendo estas últimas as principais causas dessa liberação nos ecossistemas (BRIFFA et al., 2020). Dentre os eventos naturais que propiciam a liberação de metais no ambiente, podemos citar o vulcanismo, o intemperismo, a formação rochosa e a erosão (TCHOUNWOU et al., 2012). Esses eventos naturais podem aumentar emissão de zinco, alumínio, cobre, mercúrio, manganês e níquel no ambiente (MISHRA et al., 2019; SEAWARD; RICHARDSON, 1990). No que se refere às ações antropogênicas, houve um aumento expressivo da utilização de metais a partir da crescente e rápida industrialização, causando poluição nos ecossistemas aquáticos e terrestres (NAGAJYOTI et al., 2010).

Dentre as atividades que geralmente causam contaminação de ambientes por metais, destacam-se: mineração, fundição, indústria têxtil, pintura, galvanoplastia, corantes, curtume, fabricação de papel, agricultura (fertilizantes), esgoto doméstico e aterros sanitários (HE et al., 2005; MCRAE et al., 2016; MISHRA et al., 2019; NAGAJYOTI et al., 2010; TCHOUNWOU et al., 2012). No Brasil, catástrofes ambientais ocorridas em decorrência de ruptura de barragens de rejeitos de mineração, em 2015 (distrito Bento Rodrigues, em Mariana-MG) e em 2019 (em Brumadinho-MG), elevaram os níveis de metais nos corpos d'água, causando grande preocupação (VERGILIO et al., 2020; VERGILIO et al., 2021). No Brasil, a resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) regulamenta as concentrações máximas permitidas de metais em águas doces (classes I, II, III e IV), águas salinas (classes I, II e III) e águas salobras (classes I, II e III) (BRASIL, 2005).

A contaminação por metais causa preocupação, uma vez que os mesmos não são biodegradáveis e não podem ser decompostos, sendo contaminantes persistentes no ambiente (MISHRA et al., 2019). No entanto, alguns organismos possuem mecanismos fisiológicos para desintoxicação e excreção dos metais (BATTUELLO et al., 2016; BRIFFA et al., 2020; SRUTHI et al., 2016). Sabe-se que a dose, rota de exposição e especiação química são fatores importantes na toxicidade de metais (TCHOUNWOU et al., 2012).

1.2. Substâncias-teste

1.2.1. Zinco

Zinco (Zn) é o 23º elemento mais abundante na crosta da Terra (United States Geological Survey - USGS, 2022) e 2º elemento traço mais abundante para maioria dos vertebrados (HOGSTRAND; FU, 2014). Apesar de haver registros pré-históricos de uso do Zn, na Europa esse elemento passou a ser produzido para comercialização apenas na metade do século XVIII (BURGESS; PRINCE, 2005). Atualmente, as reservas mundiais de Zn chegam a 1,9 bilhões de toneladas e a produção mundial alcança 13 toneladas métricas (Mt), segundo estimativas de *United States Geological Survey - USGS* (2022). O Zn é utilizado para diversos fins, tais como: agente anticorrosivo de ferro e aço, revestimento de telhados, fabricação de latão e bronze, peças automotivas, suplemento alimentar, galvanização, dentre outros (BURGESS; PRINCE, 2005; CALLENDER; RICE, 1999; KAUR et al., 2014).

O Zn é um metal essencial para plantas, animais e seres humanos (HORIE et al., 2020; MCRAE et al., 2016), sendo constituinte de diversas enzimas como, por exemplo, anidrase carbônica e de um tipo de superóxido dismutase (ALSCHER, 2002; BORAN; ULUTAS, 2016; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2005; MORONEY et al., 2001), e sendo essencial para diversos processos fisiológicos (HOGSTRAND; FU, 2014), como por exemplo, manutenção da integridade de membranas, processos de reparação do fotossistema II (FSII), neuromodulação do sistema nervoso e síntese de proteínas e ácidos nucleicos (LE FAUCHEUR et al., 2006; RICHETTI et al., 2011; TSONEV; LIDON, 2012). Apesar da essencialidade do Zn aos seres vivos, esse elemento causa efeitos tóxicos em concentrações elevadas (HORIE et al., 2020).

O Zn pode ser liberado na atmosfera e nos ecossistemas aquáticos por meio de atividades de mineração, produção de aço, queima de carvão, efluentes industriais e águas residuais urbanas (CALLENDER; RICE, 1999; KAUR et al., 2014; ZHANG et al., 2012). Segundo legislação do CONAMA, a concentração máxima permitida em águas doces da classe I é de 0,18 mg Zn L⁻¹. Analisando este elemento nos ecossistemas aquáticos do Brasil, o Zn foi encontrado em concentrações de 0,002 mg L⁻¹ no Lago Pampulha (FRIESE et al., 2010) e em maiores concentrações como, por exemplo, 1,215 mg L⁻¹ no Rio Piracicaba (RODGHER et al., 2005). Segundo estudo que sumarizou as concentrações de Zn em 100 pontos de coleta em corpos d'água brasileiros, o valor médio de Zn encontrado nesses locais foi de 0,047 mg L⁻¹ Zn (mediana = 0,014 mg L⁻¹) (GEBARA et al., 2021 - Capítulo 3).

Estudos demonstram que baixas concentrações de Zn inibem enzimas ligadas ao transporte de elétrons, causando disfunção das mitocôndrias (RICHETTI et al., 2011); bem

como também se observou alteração no potencial de membrana de mitocôndrias de microalgas, indicando alterações em sua atividade (MACHADO et al., 2015). Há evidências de que o Zn pode adentrar nas células de animais via canais de cálcio, causando efeito neurotóxico (CAI et al., 2006; SARASAMMA et al., 2018). Segundo estudo sumarizando toxicidade de Zn sobre organismos aquáticos, esse elemento é tóxico para bactérias, protozoários, algas, macrófitas, rotíferos, crustáceos e peixes, sendo que a clorofícea *Raphidocelis subcapitata* foi o organismo mais sensível, com CI50-96h de 0,03 mg L⁻¹ (GEBARA et al., 2020 - Capítulo 1).

1.2.2. Alumínio

O alumínio (Al) é o metal mais abundante da crosta terrestre (EXLEY; MOLD, 2015; HAUG; FOY, 1984; SUWALSKY et al., 2002). O ciclo de produção de Al inclui a extração de bauxita em minas, a qual é posteriormente processada em Al, sendo seus rejeitos geralmente descartados em aterros (USGS, 2022). Segundo estimativas, os recursos mundiais de bauxita estão estimados entre 55-75 bilhões de toneladas, sendo a produção mundial de alumínio estimada em 68 Mt, em 2021. Em 2025, o consumo doméstico global de Al chegará a 120 Mt e, somente no Brasil, a previsão chega a 1,7 Mt (USGS, 2010).

O Al é um dos metais mais utilizados pela sociedade, possuindo diversas aplicações, dentre elas: indústria da construção; agente coagulante em tratamentos de água; aditivo de alimentos e produção de veículos, aeronaves, refrigeradores, embalagem e transporte de produtos (BONDY, 2010; RUBINI et al., 2002; USGS, 2010).

O Al é classificado como metal não-essencial, visto que ainda não possui função biológica conhecida (PETROU, 2002; SUWALSKY et al., 2002). Apesar de ser um metal não-essencial, sabe-se que todos os seres vivos possuem Al em pequenas quantidades, sendo este metal também encontrado nos alimentos, água, solo e ar (PETROU, 2002).

A reatividade primária desse metal se deve aos íons Al³⁺, sendo sua forma iônica um competidor dos íons magnésio (Mg²⁺) e ferro (Fe²⁺, Fe³⁺) (EXLEY; MOLD, 2015). O Al pode ser transportado para o interior das células por meio de transporte paracelular, transporte transcelular, transporte ativo, por meio de canais ou poros ou por meio de endocitose. Um vez dentro das células, o Al pode ser acumulado em vesículas ou pode ser expelido por endocitose (EXLEY; MOLD, 2015). No que se refere à toxicidade do Al em água, é de extrema importância que se estude a especiação do metal e de que forma ele está complexado, de modo que, para a toxicidade aguda, os compostos com ligantes inorgânicos são mais tóxicos (RUBINI et al., 2002).

De modo geral, o Al pode exercer toxicidade sobre plantas, animais e humanos (RUBINI et al., 2002), sendo neurotóxico para animais (ZATTA et al., 2000) e afetando a eficiência da fotossíntese ou causando danos estruturais ao aparato fotossintético de plantas e microalgas (CHEN et al., 2010; HAMED et al., 2019; MOUSTAKAS et al., 1995; SAÇAN et al., 2007). Segundo estudo de distribuição de sensibilidade de espécies (*species sensitivity distribution* – SSD), o Al exerce toxicidade a diversos organismos aquáticos como, por exemplo, rotíferos, algas, peixes, crustáceos, macrófitas, anfípodas, nematódeos e lesmas. Segundo esse estudo de SSD, o rotífero *Lecane quadridentata* foi o organismo mais sensível (GEBARA et al., 2020; GUZMÁN et al., 2010)

No que se refere às concentrações de Al no ambiente, segundo o CONAMA, a concentração permitida em corpos d'água doce é de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ Al dissolvido (BRASIL, 2005). As concentrações de Al em corpos d'água brasileiros possuem grande variação, entre $0,028 \text{ mg L}^{-1}$ (Rio Todos os Santos - (PEREIRA et al., 2018)) e $3,8 \text{ mg L}^{-1}$ (Rio Sinos - (STEFFENS et al., 2015)). Segundo análise que sumariza diversos estudos acerca das concentrações de Al em 36 pontos de coleta em corpos d'água brasileiros, o valor médio de Al encontrado nesses locais foi de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ Al (mediana = $0,54 \text{ mg L}^{-1}$) (GEBARA et al., 2021 - Capítulo 3).

1.3. Misturas

Apesar de Zn e Al ocorrerem simultaneamente em corpos d'água (e.g. DALZUCHIO et al., 2017; MACHADO et al., 2017; PEREIRA et al., 2018), a maioria dos estudos ecotoxicológicos testam somente a toxicidade isolada desses metais sobre os organismos aquáticos, de modo que análises de efeitos combinados desses elementos são extremamente escassas. Dessa forma, é importante que estudos nesse sentido sejam realizados e que os dados gerados sejam modelados de maneira a se interpretar os efeitos causados por essas misturas

Compostos que exercem toxicidade possuem um modo de ação, que pode ser definido como eventos chave que ocorrem em diversos tipos de organização biológica, de natureza bioquímica ou citológica, e que levam a mudanças na anatomia ou na fisiologia de organismos (KIENZLER et al., 2017; OECD, 2017). Em misturas, os diferentes compostos podem ter modos de ação iguais ou diferentes, havendo na literatura modelos conceituais para ambos os cenários, descritos a seguir. Ambos os modelos assumem não interação entre os compostos.

O primeiro modelo a ser descrito é o modelo de adição de concentração (CA) (BERENBAUM, 1985; JONKER et al., 2005; SPRAGUE, 1969), o qual assume que as substâncias possuem modo de ação similar, e que pode ser descrito pela equação:

$$\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{ECx_i} = 1$$

Onde: C_i = concentração do químico i na mistura, CEx_i = concentração efetiva do químico i que resulta no mesmo efeito (x%) que a mistura.

Já o modelo de ação independente (IA) se baseia na probabilidade de não-resposta (BLISS, 1939; JONKER et al., 2005) e assume que as substâncias possuem modos de ação diferentes, e pode ser descrita pela equação:

$$Y = u_{\max} \prod_{i=1}^n q_i(c_i)$$

Onde: Y = resposta do *endpoint* aferido, C_i = concentração do químico i na mistura, $q_i(C_i)$ = probabilidade de não-resposta, u_{\max} = resposta do controle para *endpoint* aferido, Π = função de multiplicação

A ferramenta MIXTOX (JONKER et al., 2005) é utilizada para modelagem de dados de misturas. Além dos modelos CA e IA, a ferramenta MIXTOX calcula desvios aos modelos CA e IA, de modo a avaliar se os compostos em mistura podem interagir, sendo eles: desvio de sinergismo ou antagonismo (S/A), dependentes da proporção da dose (DR), ou dependentes do nível da dose (DL) (JONKER et al., 2005; SILVA et al., 2022).

A partir dos dados gerados pelo MIXTOX, uma das maneiras de representar graficamente os efeitos de misturas é através de isobogramas, utilizados com muita frequência para representar os dados de misturas binárias (e.g. DOS REIS et al., 2022; LOPES et al., 2016; MANSANO et al., 2020; MARTIN-DE-LUCIA et al., 2019; SANCHES et al., 2017; SILVA et al., 2020). O isobograma pode representar graficamente tanto aditividade, quanto efeitos de sinergismo (efeitos mais que aditivos) ou antagonismo (efeitos menos que aditivos). O isobograma (Figura 1) representa uma mistura binária entre substância-teste 1 (eixo x) e substância-teste 2 (eixo y). Baseado nos dados de toxicidade plotados a partir da CE50 dos compostos isolados, podemos traçar uma linha teórica de aditividade, que intercepta as CE50 de cada composto, formando uma isobole linear (Figura 1, número 1). Podemos visualizar efeitos sinérgicos quando os dados plotados se posicionam abaixo da linha de aditividade,

formando isobole de formato côncavo (Figura 1, número 2). Efeitos antagônicos são visualizados a partir de dados plotados acima da linha de aditividade, formando isobole de formato convexo (Figura 1, número 3) (ALLOATTI et al., 2013; RYALL; TAN, 2015).

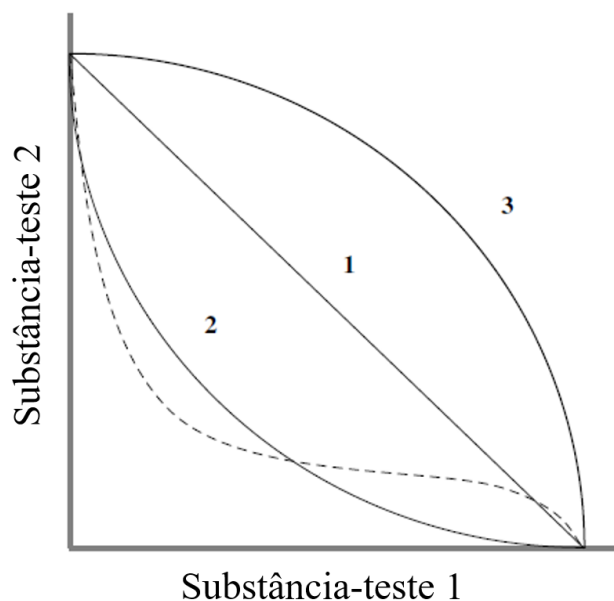


Figura 1. Isobolograma representando a interação das substâncias-teste 1 e 2. A linha (1) indica aditividade, a curva côncava (2) indica sinergismo e a curva convexa (3) indica antagonismo. Imagem adaptada de BELL (2005).

1.4. Justificativa

Nos ecossistemas aquáticos, sabe-se que os metais coocorrem, bem como é de pleno conhecimento que as ações antrópicas vêm elevando as concentrações desses elementos no ambiente. Recentemente, ocorreram no Brasil eventos que liberaram altas concentrações de metais nos ambientes naturais, causando grande preocupação quanto a uma possível perda de biodiversidade, além do elevado impacto social associado a esses desastres.

Em 2015, houve a ruptura da barragem do Fundão no distrito Bento Rodrigues, em Mariana-MG, liberando entre 34 a 50 milhões m³ de resíduos de minério de ferro no ambiente, de modo que a lama contendo esses resíduos atravessou 600 Km pela bacia do Rio Doce. Estudos detectaram aumento na concentração de metais no sedimento e/ou na água como, por exemplo, ferro, manganês, alumínio, cromo, cádmio, níquel e mercúrio (MARQUES et al., 2022; VERGILIO et al., 2021). Também foi observado acumulação dos metais alumínio, ferro,

manganês e zinco em músculo de peixes (VERGILIO et al., 2021).

Em 2019, presenciamos outro desastre ambiental, com a ruptura de uma barragem de rejeitos de mineração do Córrego do Feijão, em Brumadinho-MG, liberando cerca de 11 a 12 milhões m³ de resíduos no Rio Paraopeba. Segundo análises, os rejeitos liberados continham altas concentrações de ferro, alumínio, manganês e titânio; e as concentrações de ferro, alumínio, manganês, zinco, cobre, chumbo, cádmio e urânio estavam acima do permitido por legislação brasileira (VERGILIO et al., 2020). Estudos com os rejeitos e com água proveniente do Rio Paraopeba apontam efeitos tóxicos sobre microalgas, microcrustáceos e peixes (ROTTA et al., 2020; THOMPSON et al., 2020; VERGILIO et al., 2020).

Atualmente, a concentração máxima permitida de metais em ecossistemas aquáticos brasileiros se baseia somente na toxicidade isolada dos compostos (e.g. BRASIL, 2005). Dessa forma, em vista da crescente concentração de metais nos ambientes aquáticos e sabendo-se que os metais Zn e Al ocorrem simultaneamente nos ambientes naturais (e.g. DALZUCHIO et al., 2017; MACHADO et al., 2017; PEREIRA et al., 2018), é de extrema importância que a toxicidade isolada e combinada desses metais seja testada sobre organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos. Estudos acerca de misturas de Zn e Al sobre organismos aquáticos dulcícolas são extremamente escassos na literatura e, por isso, nos propusemos a realizar pela primeira vez essas análises. Ademais, análises de risco ecológico para corpos d'água brasileiros são de extrema importância, já que a maioria dos estudos utiliza concentrações ambientais referentes a ambientes temperados nas análises de risco. Para os testes ecotoxicológicos apresentados nesta Tese, selecionamos como organismos-teste: a microalga verde *Raphidocelis subcapitata*, o cladóceros Neotropical *Ceriodaphnia silvestrii* e embriões do peixe *Danio rerio*.

As microalgas, cladóceros e embriões de peixe são amplamente utilizados em testes de toxicidade, sendo organismos-teste recomendados por normativas nacionais e internacionais (ABNT, 2017, 2018, 2022; OECD, 2004, 2011, 2012, 2013; USEPA, 2002; b, 2012). As microalgas, cladóceros e peixes são vastamente utilizados para aferir toxicidade de metais, visto que são organismos-teste sensíveis a estes elementos (e.g. ALHO et al., 2019; DE SCHAMPHELAERE et al., 2004; DE SCHAMPHELAERE et al., 2014; DOS REIS et al., 2022; GRIFFITT et al., 2011; HORIE et al., 2020; LU et al., 2017; NYS et al., 2015; ROCHA et al., 2016; SILVA et al., 2018; ZHU et al., 2008).

Portanto, o presente estudo visou testar efeitos isolados e combinados de zinco e alumínio sobre organismos aquáticos representados por um produtor primário (*R. subcapitata*), um consumidor primário (*C. silvestrii*) e um consumidor secundário (*D. rerio*). Análises ecotoxicológicas sobre diferentes níveis tróficos são de extrema relevância, de modo a entender

os possíveis efeitos tóxicos aos ecossistemas aquáticos de maneira holística. Espera-se contribuir para o entendimento das possíveis interações dos metais, de modo a aferir possíveis efeitos esperados (aditividade), maiores que o esperado (sinergismo) ou menores que o esperado (antagonismo).

Referências bibliográficas

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2017. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). NBR 13373**. Rio de Janeiro, RJ. 20 pp. 2017.
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlophyceae). NBR12648**. Rio de Janeiro, RJ. 27 pp. 2018.
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). NBR1271**. Rio de Janeiro, RJ. 31 pp. 2022.
- ALHO, L. O. G.; GEBARA, R. C.; PAINA, K. A.; SARMENTO, H.; MELAO, M. Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. **Ecotoxicol Environ Saf**, 169, p. 950-959, 2019.
- ALLOATTI, A.; TRIPODI, K. E.; UTTARO, A. D. Synergistic effect of inhibitors of fatty acid desaturases on *Trypanosoma* parasites. **Parasitol Res**, 2013.
- ALSCHER, R. G. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J Exp Bot**, 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- BATTUELLO, M.; BRIZIO, P.; MUSSAT SARTOR, R.; NURRA, N.; PESSANI, D.; ABETE, M. C.; SQUADRONE, S. Zooplankton from a North Western Mediterranean area as a model of metal transfer in a marine environment. **Ecol Indic**, 66, p. 440-451, 2016.
- BELL, A. Antimalarial drug synergism and antagonism: mechanistic and clinical significance. **FEMS Microbiol Lett**, 253, n. 2, p. 171-184, 2005.
- BERENBAUM, M. C. The expected effect of a combination of agents: the general solution. **J Theor Biol**, 114, n. 3, p. 413-431, 1985.
- BLISS, C. I. The Toxicity of Poisons Applied Jointly. **Ann Appl Biol**, 26, n. 3, p. 585-615, 1939.
- BONDY, S. C. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. **Neurotoxicology**, 31, n. 5, p. 575-581, 2010.
- BORAN, H.; ULUTAS, G. Genotoxic effects and gene expression changes in larval zebrafish after exposure to ZnCl₂ and ZnO nanoparticles. **Dis Aquat Organ**, 117, n. 3, p. 205-214, 2016.
- BRASIL - Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Resolução nº 357/2005** Brasília, DF. 36 pp. 2005.
- BRIFFA, J.; SINAGRA, E.; BLUNDELL, R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. **Heliyon**, 6, n. 9, p. e04691, 2020.

BURGESS, J.; PRINCE, R. H. Zinc: Inorganic & Coordination Chemistry Based in part on the article Zinc: Inorganic & Coordination Chemistry by Reg H. Prince which appeared in the Encyclopedia of Inorganic Chemistry, First Edition. *In*: KING, R. B. (Ed.). **Encyclopedia of Inorganic Chemistry**, 2005. p. 1-26.

CAI, A. L.; ZIPFEL, G. J.; SHELINE, C. T. Zinc neurotoxicity is dependent on intracellular NAD levels and the sirtuin pathway. **Eur J Neurosci**, 24, n. 8, p. 2169-2176, 2006.

CALLENDER, E.; RICE, K. C. The Urban Environmental Gradient: Anthropogenic Influences on the Spatial and Temporal Distributions of Lead and Zinc in Sediments. **Environ Sci Technol**, 34, n. 2, p. 232-238, 1999.

CHEN, L.-S.; QI, Y.-P.; JIANG, H.-X.; YANG, L.-T.; YANG, G.-H. Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. **Afr J Biotechnol**, 9, n. 54, p. 9237-9247, 2010.

DALZOCHIO, T.; RESSEL SIMOES, L. A.; SANTOS DE SOUZA, M.; PRADO RODRIGUES, G. Z.; PETRY, I. E.; ANDRIGUETTI, N. B.; HERBERT SILVA, G. J.; GEHLEN, G.; BASSO DA SILVA, L. Water quality parameters, biomarkers and metal bioaccumulation in native fish captured in the Ilha River, southern Brazil. **Chemosphere**, 189, p. 609-618, 2017.

DE SCHAMPHELAERE, K. A.; CANLI, M.; VAN LIERDE, V.; FORREZ, I.; VANHAECKE, F.; JANSSEN, C. R. Reproductive toxicity of dietary zinc to *Daphnia magna*. **Aquat Toxicol**, 70, n. 3, p. 233-244, 2004.

DE SCHAMPHELAERE, K. A.; NYS, C.; JANSSEN, C. R. Toxicity of lead (Pb) to freshwater green algae: development and validation of a bioavailability model and inter-species sensitivity comparison. **Aquat Toxicol**, 155, p. 348-359, 2014.

DOS REIS, L. L.; ALHO, L. O. G.; DE ABREU, C. B.; GEBARA, R. C.; MANSANO, A. D. S.; MELAO, M. Effects of cadmium and cobalt mixtures on growth and photosynthesis of *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyceae). **Aquat Toxicol**, 244, p. 106077, 2022.

EXLEY, C.; MOLD, M. J. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. **J Trace Elem Med Biol**, 30, p. 90-95, 2015.

FRIESE, K.; SCHMIDT, G.; DE LENA, J. C.; ARIAS NALINI, H.; ZACHMANN, D. W. Anthropogenic influence on the degradation of an urban lake – The Pampulha reservoir in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Limnologica**, 40, n. 2, p. 114-125, 2010.

GEBARA, R. C.; ALHO, L. O. G.; ABREU, C. B.; MANSANO, A. S.; MOREIRA, R. A.; ROCHA, G. S.; MELÃO, M. G. G. Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). **Environ Toxicol Chem**, 2021.

GEBARA, R. C.; ALHO, L. O. G.; ROCHA, G. S.; MANSANO, A. S.; MELÃO, M. G. G. Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae *Raphidocelis subcapitata* at environmental concentrations. **Chemosphere**, 242, p. 125231, 2020.

- GRIFFITT, R. J.; FESWICK, A.; WEIL, R.; HYNDMAN, K.; CARPINONE, P.; POWERS, K.; DENSLOW, N. D.; BARBER, D. S. Investigation of acute nanoparticulate aluminum toxicity in zebrafish. **Environ Toxicol**, 26, n. 5, p. 541-551, 2011.
- GUZMÁN, F. T.; GONZÁLEZ, F. J.; MARTÍNEZ, R. R. Implementing *Lecane quadridentata* acute toxicity tests to assess the toxic effects of selected metals (Al, Fe and Zn). **Ecotoxicol Environ Saf**, 73, n. 3, p. 287-295, 2010.
- HAMED, S. M.; HASSAN, S. H.; SELIM, S.; KUMAR, A.; KHALAF, S. M. H.; WADAAN, M. A. M.; HOZZEIN, W. N.; ABDELGAWAD, H. Physiological and biochemical responses to aluminum-induced oxidative stress in two cyanobacterial species. **Environ Pollut**, 251, p. 961-969, 2019.
- HAUG, A.; FOY, C. E. Molecular aspects of aluminum toxicity. **Crit Rev Plant Sci**, 1, n. 4, p. 345-373, 1984.
- HE, Z. L.; YANG, X. E.; STOFFELLA, P. J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. **J Trace Elem Med Biol**, 19, n. 2-3, p. 125-140, 2005.
- HOGSTRAND, C.; FU, D. Zinc. In: MARET, W. e WEDD, A. (Ed.). **Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells**: ROYAL SOC CHEMISTRY, 2014. p. 666-694. (Metallobiology).
- HORIE, Y.; YONEKURA, K.; SUZUKI, A.; TAKAHASHI, C. Zinc chloride influences embryonic development, growth, and Gh/Igf-1 gene expression during the early life stage in zebrafish (*Danio rerio*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 230, p. 108684, 2020.
- JONKER, M. J.; SVENDSEN, C.; BEDAUX, J. J. M.; BONGERS, M.; KAMMENGA, J. E. Significance Testing of Synergistic/Antagonistic, Dose Level-Dependent, or Dose Ratio-Dependent Effects in Mixture Dose-Response Analysis. **Environ Toxicol Chem**, 24, n. 10, p. 2701-2713, 2005.
- KAUR, K.; GUPTA, R.; SARAF, S. A.; SARAF, S. K. Zinc: The Metal of Life. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, 13, n. 4, p. 358-376, 2014.
- KIENZLER, A.; BARRON, M. G.; BELANGER, S. E.; BEASLEY, A.; EMBRY, M. R. Mode of Action (MOA) Assignment Classifications for Ecotoxicology: An Evaluation of Approaches. **Environ Sci Technol**, 51, n. 17, p. 10203-10211, 2017.
- LE FAUCHEUR, S.; SCHILDKNECHT, F.; BEHRA, R.; SIGG, L. Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. **Aquat Toxicol**, 80, n. 4, p. 355-361, 2006.
- LOPES, S.; PINHEIRO, C.; SOARES, A.; LOUREIRO, S. Joint toxicity prediction of nanoparticles and ionic counterparts: Simulating toxicity under a fate scenario. **J Hazard Mater**, 320, p. 1-9, 2016.
- LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ELLIS, D. R.; GRUSAK, M. A. Effect of zinc and manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and raz mutant plants. **Plant Sci**, 168, n. 4, p. 1015-1022, 2005.

- LU, N.; SUN, S.; SONG, W.; JIA, R. Behavioural toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to waterborne zinc and chromium (VI). **Chem Ecol**, 33, n. 8, p. 725-738, 2017.
- MACHADO, C. S.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I. S.; TONANI, K. A. A.; SIERRA, J.; MARTINIS, B. S.; CELERE, B. S.; MARI, M.; SCHUHMACHER, M.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUNOZ, S. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. **Environ Sci Pollut Res**, 24, n. 25, p. 20160-20172, 2017.
- MACHADO, M. D.; LOPES, A. R.; SOARES, E. V. Responses of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to long-term exposure to metal stress. **J Hazard Mater**, 296, p. 82-92, 2015.
- MANSANO, A. S.; MOREIRA, R. A.; DORNFELD, H. C.; FREITAS, E. C.; VIEIRA, E. M.; DAAM, M. A.; ROCHA, O.; SELEGHIM, M. H. R. Individual and mixture toxicity of carbofuran and diuron to the protozoan *Paramecium caudatum* and the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicol Environ Saf**, 201, p. 110829, 2020.
- MARQUES, J. A.; COSTA, S. R.; MARASCHI, A. C.; VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; DE MARTINEZ GASPAR MARTINS, C.; SANTOS, H. F.; SOUZA, M. M.; SANDRINI, J. Z.; BIANCHINI, A. Biochemical response and metals bioaccumulation in planktonic communities from marine areas impacted by the Fundao mine dam rupture (southeast Brazil). **Sci Total Environ**, 806, n. Pt 3, p. 150727, 2022.
- MARTIN-DE-LUCIA, I.; GONCALVES, S. F.; LEGANES, F.; FERNANDEZ-PINAS, F.; ROSAL, R.; LOUREIRO, S. Combined toxicity of graphite-diamond nanoparticles and thiabendazole to *Daphnia magna*. **Sci Total Environ**, 688, p. 1145-1154, 2019.
- MCRAE, N. K.; GAW, S.; GLOVER, C. N. Mechanisms of zinc toxicity in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 179, p. 184-190, 2016.
- MISHRA, S.; BHARAGAVA, R. N.; MORE, N.; YADAV, A.; ZAINITH, S.; MANI, S.; CHOWDHARY, P. Heavy Metal Contamination: An Alarming Threat to Environment and Human Health. In: **Environmental Biotechnology: For Sustainable Future**, 2019. p. 103-125.
- MORONEY, J. V.; BARTLETT, S. G.; SAMUELSSON, G. Carbonic anhydrases in plants and algae. **Plant Cell Environ**, 24, n. 2, p. 141-153, 2001.
- MOUSTAKAS, M.; OUZOUNIDOU, G.; LANNOYE, R. Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum-tolerant and non-tolerant wheat cultivar. **J Plant Nutr**, 18, n. 4, p. 669-683, 1995.
- NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environ Chem Lett**, 8, n. 3, p. 199-216, 2010.
- NOUR, H. E.; EL-SOROBY, A. S.; ABD EL-WAHAB, M.; NOUH, E. S.; MOHAMADEN, M.; AL-KAHTANY, K. Contamination and ecological risk assessment of heavy metals pollution from the Shalateen coastal sediments, Red Sea, Egypt. **Mar Pollut Bull**, 144, p. 167-172, 2019.

NYS, C.; ASSELMAN, J.; HOCHMUTH, J. D.; JANSSEN, C. R.; BLUST, R.; SMOLDERS, E.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. Mixture toxicity of nickel and zinc to *Daphnia magna* is noninteractive at low effect sizes but becomes synergistic at high effect sizes. **Environ Toxicol Chem**, 34, n. 5, p. 1091-1102, 2015.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline for testing of chemicals. *Daphnia* sp., acute immobilisation test. OECD 202.** Paris. 12 pp pp. 2004.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. **OECD Guidelines for the testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.** 25 pp. 2011.

OECD - Organisation For Economic Cooperation And Development. **Test Guideline No. 211. *Daphnia magna* reproduction test.** 25 pp. 2012.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. **OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.** 22 pp. 2013.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. **Revised Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways.** 2017. Disponível em:

<https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282013%296&doclanguage=en>. Acesso em: Fevereiro/2022.

PEREIRA, C. A. F.; MAIA, L. F. O.; FARIA, M. C. S.; FIDENCIO, P. H.; BOMFETI, C. A.; BARBOSA JUNIOR, F.; RODRIGUES, J. L. Seasonal variations, metal distribution and water quality in the Todos os Santos River, Southeastern Brazil: a multivariate analysis. **An Acad Bras**, 90, n. 3, p. 2701-2710, 2018.

PETROU, A. L. Interactions of aluminum(III) with the biologically relevant ligand d-ribose. **Coord Chem Rev**, 228, n. 2, p. 153-162, 2002.

RICHETTI, S. K.; ROSEMBERG, D. B.; VENTURA-LIMA, J.; MONSERRAT, J. M.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **Neurotoxicology**, 32, n. 1, p. 116-122, 2011.

ROCHA, G. S.; PARRISH, C. C.; LOMBARDI, A. T.; DA, G. G. M. M. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). **Ecotoxicology**, 25, n. 8, p. 1468-1477, 2016.

RODGHER, S.; ESPINDOLA, E. L.; ROCHA, O.; FRACACIO, R.; PEREIRA, R. H.; RODRIGUES, M. H. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tiete River (Sao Paulo, Brazil). **Braz J Biol**, 65, n. 4, p. 697-710, 2005.

ROTTA, L. H. S.; ALCÂNTARA, E.; PARK, E.; NEGRI, R. G.; LIN, Y. N.; BERNARDO, N.; MENDES, T. S. G.; SOUZA FILHO, C. R. The 2019 Brumadinho tailings dam collapse: Possible cause and impacts of the worst human and environmental disaster in Brazil. **Int J Appl Earth Obs Geoinf**, 90, p. 102119, 2020.

RUBINI, P.; LAKATOS, A.; CHAMPMARTIN, D.; KISS, T. Speciation and structural aspects of interactions of Al(III) with small biomolecules. **Coord Chem Rev**, 228, n. 2, p. 137-152, 2002.

RYALL, K. A.; TAN, A. C. Systems biology approaches for advancing the discovery of effective drug combinations. **J Cheminform**, 7, p. 7, 2015.

SAÇAN, M. T.; OZTAY, F.; BOLKENT, S. Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to lead and aluminum: toxicity and effects on ultrastructure. **Biol Trace Elem Res**, 120, n. 1-3, p. 264-272, 2007.

SANCHES, A. L. M.; VIEIRA, B. H.; REGHINI, M. V.; MOREIRA, R. A.; FREITAS, E. C.; ESPINDOLA, E. L. G.; DAAM, M. A. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 188, p. 582-587, 2017.

SARASAMMA, S.; AUDIRA, G.; JUNIARDI, S.; SAMPURNA, B. P.; LIANG, S. T.; HAO, E.; LAI, Y. H.; HSIAO, C. D. Zinc Chloride Exposure Inhibits Brain Acetylcholine Levels, Produces Neurotoxic Signatures, and Diminishes Memory and Motor Activities in Adult Zebrafish. **Int J Mol Sci**, 19, n. 10, 2018.

SEAWARD, M. R. D.; RICHARDSON, D. H. S. Atmospheric sources of metal pollution and effects on vegetation. In: SHAW, A. J. (Ed.). **Heavy metal tolerance in plants evolutionary aspects**: Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 75-94.

SILVA, A. R. R.; GONCALVES, S. F.; PAVLAKI, M. D.; MORGADO, R. G.; SOARES, A.; LOUREIRO, S. Mixture toxicity prediction of substances from different origin sources in *Daphnia magna*. **Chemosphere**, 292, p. 133432, 2022.

SILVA, J. C.; ECHEVESTE, P.; LOMBARDI, A. T. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. **Ecotoxicol Environ Saf**, 161, p. 57-63, 2018.

SILVA, L. C. M.; MOREIRA, R. A.; PINTO, T. J. S.; OGURA, A. P.; YOSHII, M. P. C.; LOPES, L. F. P.; MONTAGNER, C. C.; GOULART, B. V.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology**, 29, n. 9, p. 1462-1475, 2020.

SPRAGUE, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish I. Bioassay methods for acute toxicity. **Water Res**, 3, n. 11, p. 793-821, 1969.

SRUTHI, P.; SHACKIRA, A. M.; PUTHUR, J. T. Heavy metal detoxification mechanisms in halophytes: an overview. **Wetl Ecol Manag**, 25, n. 2, p. 129-148, 2016.

STEFFENS, C.; KLAUCK, C. R.; BENVENUTI, T.; SILVA, L. B.; RODRIGUES, M. A. Water quality assessment of the Sinos River - RS, Brazil. **Braz J Biol**, 75, n. 4 Suppl 2, p. S62-S67, 2015.

SUWALSKY, M.; NORRIS, B.; KISS, T.; ZATTA, P. Effects of Al(III) speciation on cell membranes and molecular models. **Coord Chem Rev**, 228, n. 2, p. 285-295, 2002.

TCHOUNWOU, P. B.; YEDJOU, C. G.; PATLOLLA, A. K.; SUTTON, D. J. Heavy metal toxicity and the environment. *In*: LUCH, A. (Ed.). **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**: Springer, Basel, 2012. v. 101, p. 133-164.

THOMPSON, F.; DE OLIVEIRA, B. C.; CORDEIRO, M. C.; MASI, B. P.; RANGEL, T. P.; PAZ, P.; FREITAS, T.; LOPES, G.; SILVA, B. S.; A, S. C.; SOARES, M.; LACERDA, D.; DOS SANTOS VERGILIO, C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; THOMPSON, C.; DE REZENDE, C. E. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **Sci Total Environ**, 705, p. 135914, 2020.

TSONEV, T.; LIDON, F. C. Zinc in plants - An overview. **Emirates Journal of Food and Agriculture** 24, n. 4, p. 322-333, 2012.

USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Washington, DC. 266 pp. 2002a.

USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms**. Washington, DC. 335 pp. 2002b.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Ecological Effects Test Guidelines. OCSPP 850.4500: Algal Toxicity**. 26 pp. 2012.

USGS - United States Geological Survey. **The global flow of aluminum from 2006 through 2025**. 2010. Disponível em: <https://pubs.usgs.gov/ofr/2010/1256/>. Acesso em: Fevereiro/2022.

USGS - United States Geological Survey. **Mineral Commodity Summaries 2022**. 2022. Disponível em: <https://pubs.usgs.gov/periodicals/mcs2022/mcs2022.pdf>. Acesso em: Fevereiro/2022.

VERGILIO, C. D. S.; LACERDA, D.; OLIVEIRA, B. C. V.; SARTORI, E.; CAMPOS, G. M.; PEREIRA, A. L. S.; AGUIAR, D. B.; SOUZA, T. D. S.; ALMEIDA, M. G.; THOMPSON, F.; REZENDE, C. E. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 5936, 2020.

VERGILIO, C. S.; LACERDA, D.; DA SILVA SOUZA, T.; DE OLIVEIRA, B. C. V.; FIORESI, V. S.; DE SOUZA, V. V.; DA ROCHA RODRIGUES, G.; DE ARAUJO MOREIRA BARBOSA, M. K.; SARTORI, E.; RANGEL, T. P.; DE ALMEIDA, D. Q. R.; DE ALMEIDA, M. G.; THOMPSON, F.; DE REZENDE, C. E. Immediate and long-term impacts of one of the worst mining tailing dam failure worldwide (Bento Rodrigues, Minas Gerais, Brazil). **Sci Total Environ**, 756, p. 143697, 2021.

ZATTA, P.; LAIN, E.; CAGNOLINI, C. Effects of aluminum on activity of krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate. **Eur J Biochem**, 267, n. 10, p. 3049-3055, 2000.

ZHANG, X.; YANG, L.; LI, Y.; LI, H.; WANG, W.; YE, B. Impacts of lead/zinc mining and smelting on the environment and human health in China. **Environ Monit Assess**, 184, n. 4, p. 2261-2273, 2012.

ZHU, X.; ZHU, L.; DUAN, Z.; QI, R.; LI, Y.; LANG, Y. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. **J. Environ. Sci. Health A** 43, n. 3, p. 278-284, 2008.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dois metais, zinco (essencial) e alumínio (não essencial), isolados e em mistura, sobre organismos aquáticos dulcícolas de diferentes níveis tróficos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos isolados e combinados de zinco (Zn) e alumínio (Al) sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*, utilizando-se citometria de fluxo e fluorescência de pulso de amplitude modulada para a análise de: densidade celular, morfologia celular, tamanho celular, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) e eficiência do fotossistema II (FSII);
- Determinar os efeitos isolados e combinados de Zn e Al sobre o cladóceros Neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*, por meio de testes de toxicidade aguda, taxas de ingestão e análise de risco preliminar para corpos d'água brasileiros.
- Determinar os efeitos isolados de Zn e Al sobre o cladóceros Neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*, por meio de testes de toxicidade crônica;
- Determinar os efeitos isolados de Zn sobre estágios iniciais de *Danio rerio*, por meio de testes de sobrevivência (5-d) e através de aferimento da incorporação de elementos essenciais; bem como aferir efeitos de Zn sobre comportamento de natação de *D. rerio*
- Realizar análise de risco ecológico do Zn para corpos d'água brasileiros utilizando organismos de 3 níveis tróficos distintos;
- Construir curvas de distribuição da sensibilidade de espécies (SSD) para Zn e Al, de modo a analisar quais são as espécies mais sensíveis a esses compostos;
- Determinar a especiação de Zn e Al nas soluções-teste por meio de modelo de equilíbrio químico.

2.3. HIPÓTESES

- 1) Os metais Zn e Al causam efeitos deletérios à microalga *R. subcapitata*, ao cladóceros *C. silvestrii* e para *D. rerio*;
- 2) Nas soluções-teste, o Zn tem maior quantidade de íons livre (Zn^{2+}) do que o Al (Al^{3+});
- 3) Os efeitos combinados dos metais Zn e Al são diferentes de seus efeitos isolados;
- 4) *R. subcapitata*, *C. silvestrii* e *D. rerio* são espécies adequados para as análises, haja vista que são seres sensíveis a metais em geral;
- 5) Misturas de Zn e Al representam potencial risco ecológico para os corpos d'água do Brasil.

CAPÍTULO 1

Misturas de zinco e alumínio exercem efeitos sinérgicos sobre a alga
Raphidocelis subcapitata em concentrações ambientalmente
relevantes

Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae
Raphidocelis subcapitata at environmental concentrations

Está é a versão aceita para publicação do seguinte artigo: Gebara, R. C., Alho, L.O.G., Rocha, G.S., Mansano, A.S., Melão, M.G.G. 2020. Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae *Raphidocelis subcapitata* at environmental concentrations. *Chemosphere*, 242, 125231, o qual foi publicado em sua versão final em [<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125231>]. Este artigo está publicado sob *copyrights* da Elsevier.

This is the accepted version of the following article: Gebara, R. C., Alho, L.O.G., Rocha, G.S., Mansano, A.S., Melão, M.G.G. 2020. Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae *Raphidocelis subcapitata* at environmental concentrations. *Chemosphere*, 242, 125231, which has been published in final form at [<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125231>]. This article is published under Elsevier's copyrights.

Capítulo 1. Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae *Raphidocelis subcapitata* at environmental concentrations

Abstract

A large number of metals is present in aquatic ecosystems, often occurring simultaneously, however, the isolated toxicity of them are better well known than their mixtures. Based on that, for the first time we aimed to test the effects of zinc (Zn) and aluminum (Al) mixtures to the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. Regarding isolated toxicity, the 96h IC₅₀ of Zn and Al based on specific growth rates occurred, respectively, at 0.40 and 27.40 μM , thus Zn was \approx 70-fold more toxic than Al. Both Zn and Al altered the cell size and complexity of *R. subcapitata* at the highest concentrations, although only during Zn exposure was the chlorophyll *a* fluorescence significantly diminished. Microalgae exposed to Al produced more ROS than during Zn exposure. Moreover, algae produced less ROS at the highest Zn concentration than in the lower concentrations. According to species sensitivity curves (SSD), *R. subcapitata* was the most sensitive organism to Zn and one of the most sensitive to Al. With respect to mixture toxicity tests, there were significant deviations for both CA (concentration addition) and IA (independent action) models, although data best fitted the CA model and DL (dose level-dependence) deviation, in which metals showed synergic effects at low concentrations and antagonist effects at higher concentrations.

Keywords: antagonism; combined effects; ecotoxicology; metal stress; ROS; species sensitivity distribution

Highlights

- Zn was ≈ 70 -fold more toxic than Al to *R. subcapitata* according to 96 h IC₅₀ values
- Zn diminished chlorophyll a fluorescence, while Al led to higher ROS production
- *R. subcapitata* was the most sensitive organism to Zn according to the SSD curve
- In mixture experiments, the data best fitted the CA model and DL deviation
- We found synergic effects in low metal concentrations during mixture tests

1. Introduction

Metal contamination in natural environments is a current problem of great concern since potable water is increasingly scarce around the world, and the biodiversity of aquatic organisms has been threatened. It is known that anthropogenic actions may alter metal concentrations in water, e.g. severe environmental disasters that occurred in Brazil - in 2015, a mining company's dam collapsed in the city of Mariana, releasing a large amount of tailings into the Doce river throughout 663.2 Km (Fernandes et al., 2016), consequently increasing metal concentrations in water above permitted levels by CONAMA (The National Council for the Environment, Brazil) (Brazil, 2005; Carvalho et al., 2017). Other Brazilian aquatic environments are also contaminated with metals (Souza et al., 2016; Cruz et al., 2019; Silva et al., 2019), which may be toxic to many organisms (e.g. Hsieh et al., 2004; Madoni and Romeo, 2006; Shuhaimi-Othman et al., 2012; Okamoto et al., 2015). In 2019, another Brazilian dam collapsed in the city of Brumadinho (Lopes et al., 2019), whose impacts still need to be carefully assessed.

Organisms are simultaneously exposed to metals via waterborne and dietary routes (Wang, 2012). The guidelines for regulation of the maximum permissible metal concentrations in water are usually based on single metal toxicity (Meyer et al., 2015) (e.g. Brazil, 2005;

USEPA, 2019). However, there is a wide variety of metals coexisting in aquatic ecosystems, thus the organisms are exposed to these compounds simultaneously (USEPA, 2007; Altenburger et al., 2013). Therefore, the study of combined metal effects is highly important to assess their toxicity in a more realistic way.

Metals can be categorized in essential metals, which in low concentrations are essential to life, and non-essential metals, without known function on metabolism. Zinc (Zn) is an essential metal (Eisler, 1993), whose world mine production was 13 million tons in 2018 and worldwide reserves estimated to 1.9 billion tons (USGS, 2019b). Zinc has been used for many purposes such wastewater degradation and as an antimicrobial agent (Lam et al., 2012; Pasquet et al., 2014), and according to studies, it is toxic to bacteria – EC₅₀: 12.0 mg L⁻¹ (Toussaint et al., 1995), algae – IC₅₀: 0.63 mg L⁻¹ (Wilde et al., 2006), rotifer – LC₅₀: 1.66 mg L⁻¹ (Nelson and Roline, 1998), protozoan – EC₅₀: 7.1 mg L⁻¹ (Blinova et al., 2010), crustacean – LC₅₀: 0.17 mg L⁻¹ (Cooper et al., 2009), fish – EC₅₀: 5.8 mg L⁻¹ (Shedd et al., 1999) and macrophyte – EC₅₀: 0.9 mg L⁻¹ (Naumann et al., 2007).

On the other hand, aluminum (Al) is a non-essential metal (Exley and House, 2011) with world reserves of bauxite between 55-75 billion tons (USGS, 2019a). Regarding industrial applications, Al has been used in antiperspirants, food preservatives and automobile structures (Soni et al., 2001; Callewaert et al., 2014). This metal is toxic to algae – EC₅₀: 10.90 mg L⁻¹ (Eisentraeger et al., 2003), rotifer – LC₅₀: 0.16 mg L⁻¹ (Guzmán et al., 2010), crustacean – EC₅₀: 0.93 mg L⁻¹ (Okamoto et al., 2015), amphipods – EC₅₀: 22.0 mg L⁻¹ (Gostomski, 1990), nematode – EC₅₀: 18.15 mg L⁻¹ (Wah Chu and Chow, 2002), gastropod – EC₅₀: 30.60 mg L⁻¹ (Gostomski, 1990), fish – LC₅₀: 7.92 mg L⁻¹ (Griffitt et al., 2008) and macrophyte – IC₅₀: 2.50 mg L⁻¹ (Stanley, 1974).

Since Zn and Al have been used in domestic and industrial activities, these metals may inevitably end up in aquatic environments and co-occur in mixtures. Studies in Brazilian rivers

report environmental concentrations about 10-140 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$ and 35.70-2600 $\mu\text{g Al L}^{-1}$ (Weber et al., 2013; Silva et al., 2017; Bianchi et al., 2019). Although the isolated effects of Zn and Al are well known, as far as we know, studies of binary mixture toxicity of Zn and Al on algae only addressed combined effects of Zn-Cu, Zn-Cd, Zn-Ni and Al-Pb (Franklin et al., 2002; Saçan et al., 2007; Nagai and De Schampelaere, 2016), thus there is a lack of knowledge of the combined effects of Zn-Al to algae and to the freshwater organisms in general, although these metals may co-occur in natural environments.

Therefore, the present study intends to fill this gap, studying the isolated ((assessing growth, size and cellular complexity, chlorophyll *a* fluorescence and ROS (reactive oxygen species) production)) and combined effects (growth rates) of Zn and Al to the cosmopolitan Chlorophyceae *Raphidocelis subcapitata*, a standardized test organism widely recommended in ecotoxicology studies and sensitive to toxicants. Besides that, we plotted species sensitivity distribution (SSD) curves to determine *R. subcapitata* position and to determine its sensitivity to Zn and Al compared to other aquatic organisms.

Among the most used endpoints to assess the toxicity on algae, the cell growth is a widely recommended parameter (OECD, 2002; USEPA, 2012). In addition, the flow cytometry is also an important tool in toxicity tests on microalgae (Franqueira et al., 2000), providing multiple parameters, such as cell size, cellular complexity and chlorophyll *a* fluorescence, frequently related to the efficiency of the photosynthetic processes. ROS measurements are relevant, since their increase are related to lipidic peroxidation, e.g. peroxidation of the thylakoid membranes during metal stress (Rai et al., 2016), possibly impairing photosynthesis.

Our results on metal interactions at low and high levels are greatly important to guide new resolutions for metal concentrations in freshwater ecosystems, since microalgae are at the base of food webs and the effects on this trophic level could disturb consumers from higher trophic levels.

2. Material and methods

2.1. Algae culture and toxicity tests

Raphidocelis subcapitata was cultured in half-strength CHU-10 medium (Nalewajko and O'Mahony, 1989) at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in a 12 h/12 h of light ($\cong 3900$ lux, fluorescent light)/dark photoperiod. Culture medium was autoclaved (121°C , 1 atm above standard pressure, 20 min) prior to its use. The cultures in exponential growth were inoculated at 5×10^4 cells mL^{-1} in 500 mL polycarbonate flasks filled with 250 mL of test solutions. The algae were exposed to Zn and Al, in their isolated (control – $0.0008 \mu\text{M}$ Zn and no Al addition; 0.08 , 0.15 , 0.23 and $0.46 \mu\text{M}$ Zn; 14.82 , 22.24 , 29.65 and $37.06 \mu\text{M}$ Al) and combined (full factorial design, 24 treatments (Fig. 1) forms, in triplicate for 96h. Stock solutions of Zn and Al were obtained from Titrisol standard solutions of ZnCl_2 ($1000 \text{ mg Zn L}^{-1}$) and AlCl_3 ($1000 \text{ mg Al L}^{-1}$) (Merck, Germany). The concentrations tested are among the measured concentrations in natural ecosystems.

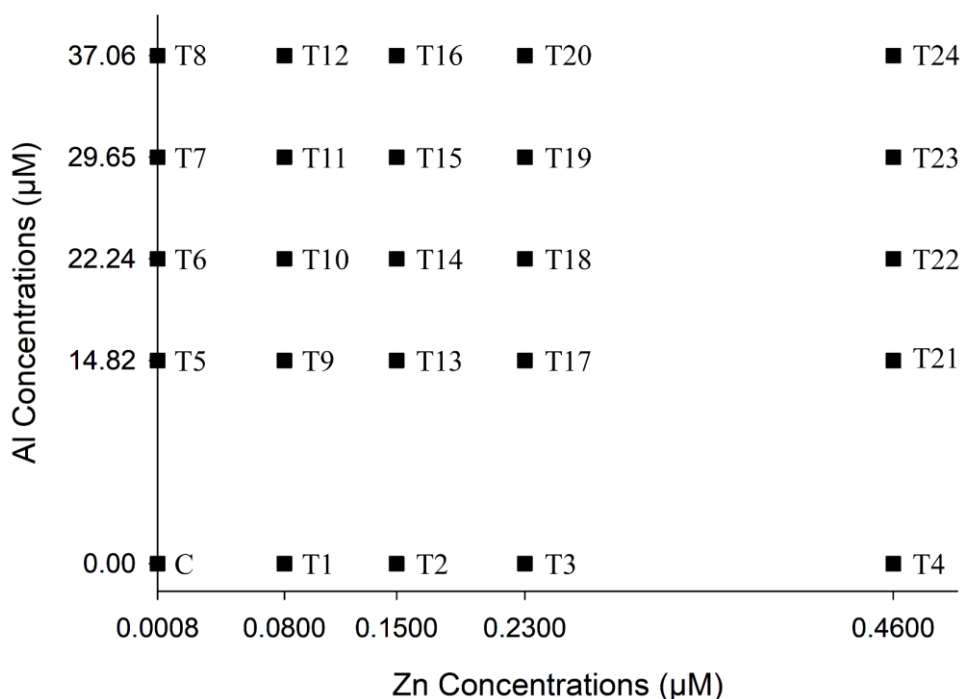


Fig. 1 Full factorial design of the toxicity test with isolated and combined zinc and aluminum. Treatments T1 to T8 refer to isolated compounds, while T9 to T24 refer to mixture of metals, where C = control group.

2.2. Cytometer analysis

Samples (495 μL) were run in a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) with a 15 mW blue-argon ion laser (488 nm excitation), using 10 μL of 6 μm fluorescent beads (Fluoresbrite carboxylate microspheres; Polysciences, Warrington, Pennsylvania, USA) as a standard pattern. FSC-H, SSC-H and FL3-H parameters correspond to cell size, cellular complexity and chlorophyll *a* fluorescence, respectively. To determine the cell density, we analyzed SSC-H vs FL3-H, following Sarmiento et al. (2008) procedures. The ROS measurements were made according to Hong et al. (2009), adding 5 μL of DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, CAS number 2044–85-1, Sigma Aldrich) in dimethylsulfoxide (10^4 μM DCFH-DA) and diluted in samples to a final concentration of 10 μM DCFH-DA; ROS were determined analyzing FL3-H vs FL1-H (green fluorescence) parameters. Cytometer extracted data were analyzed in FlowJo software, version V10.0 (Treestar.com, USA). Relative FL1-H and relative ROS (%) were calculated as follows by equations (1) and (2):

$$\text{FL1-H}_{\text{relative}} = \log(\text{FL1-H of samples}) / \log(\text{FL1-H of beads}) \quad (1)$$

$\text{ROS} (\%) = (\text{FL1-H of metal treatments} / \text{FL1-H of control group}) \times 100 \quad (2)$ (Hong et al., 2009)

2.3. Metal determination

Metals were determined in test solutions by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, iCAP 7000 Series, Thermo Scientific), in order to ensure the nominal concentrations of metal added. Isolated compounds and their mixture determinations are available in Figure S1 (Supplementary material). Since nominal concentrations did not vary more than 20% from actual concentrations (OECD, 2002), the nominal concentrations were maintained. The limits of detection were 0.2 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$ and 1.3 $\mu\text{g Al L}^{-1}$, while quantification

limits were $0.5 \mu\text{g Zn L}^{-1}$ and $4.0 \mu\text{g Al L}^{-1}$. Moreover, Zn and Al free ions were predicted in test solutions by MINEQL⁺ chemical equilibrium program (version 4.6), by modeling data taking into account test conditions, metal concentrations and algae medium chemical composition.

2.4. Data analysis

For statistically significant differences and NOEC (no observed effect concentration) and LOEC (lowest observed effect concentration) values, normal data were tested using one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's post-hoc test, while non-normal data were compared with Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test. The normality of residuals was assessed using R version 3.4.1 (R Development Core Team, 2017) with Shapiro-Wilk test and using a half-normal graph of probabilities with a simulation envelope (Moral et al., 2018). For all analyses, $\alpha = 0.05$. The IC₅₀ values were calculated using specific growth rates, by non-linear regression, with a sigmoidal three parameter logistic curve: $Y = \text{max}/1 + (C/\text{IC}_{50})^\beta$, where Y = response of a parameter, max = the maximum response of this parameter, C = concentration of the chemical, β = slope, and IC₅₀ = inhibition concentration. The specific growth rates were calculated according to USEPA (2012) equation (3):

$$\mu = [\ln(d_f) - \ln(d_i)] / t \quad (3)$$

where: μ = specific growth rate (day^{-1}); d_f = observed biomass (cell density) at the end of the experiment; d_i = observed biomass (cell density) at the beginning of the experiment; t = time of exposure (in days).

SSD (species sensitivity distribution) curves were plotted with log-normal values of

EC/IC₅₀ toxicity data for Zn and Al using the ETX 2.0 program (Van Vlaardingen et al., 2004) and assuming a 5% log-normality according to the Anderson-Darling test. Moreover, we calculated the H₅ (hazardous concentrations for 5% of the species) and H₅₀ (hazardous concentrations for 50% of the species) (Aldenberg and Jaworska, 2000).

With regards to the analysis of isolated compounds and mixture treatments, the data obtained from toxicity tests were compared to predicted effects of CA (concentration addition) and IA (independent action) models using the MIXTOX tool (Jonker et al., 2005). For CA and IA models, the following deviations were modeled: synergism/antagonism (S/A), dose ratio-dependent (DR), dose level-dependent (DL), by adding the parameters “a” and “b”. In S/A deviation, “a” becomes negative in synergism interactions, and positive in antagonism. In DR, an addition parameter (“b_{DR}”) was added, indicating that the deviation from the reference model is controlled by the composition of the mixture. In DL, “a” parameter determines the deviations in low and high doses ($a > 0$ = antagonism; $a < 0$ = synergism) and “b_{DR}” indicates in which dose level the deviation changed. For additional information, details are available in Jonker et al. (2005). After the model evaluation, the best fit was chosen through the maximum likelihood method and the best representative deviation was statistically identified.

3. Results and discussion

3.1. Single compounds toxicity

According to our results, the specific growth rates of *R. subcapitata* exposed to Zn and Al singly declined as the concentration of metals increased (Fig. 2a and c). The 96h IC₅₀ for Zn was $0.399 \pm 0.102 \mu\text{M}$ ($= 0.026 \pm 0.007 \text{ mg Zn L}^{-1}$) (Table 1), lower than literature data of 72h EC₅₀ of $0.042 \text{ mg Zn L}^{-1}$ (Aruoja et al., 2009) and 96h EC₅₀ of $0.045 \text{ mg Zn L}^{-1}$ (Blaise et al., 1986); however, the IC₅₀ value for Zn in the present study was higher than 96h EC₅₀ of $0.006 \text{ mg Zn L}^{-1}$ reported by Santos-Medrano and Rico-Martínez (2015). With respect to Al, the 96h

IC₅₀ occurred at $27.399 \pm 1.156 \mu\text{M}$ ($= 0.739 \pm 0.031 \text{ mg Al L}^{-1}$) (Table 1), higher than 96h EC₅₀ of 0.34 and 0.57 mg Al L⁻¹ reported by Santos-Medrano and Rico-Martínez (2015) and Gostomski (1990), respectively.

In the present study, the LOEC for Zn was 0.08 μM (Dunnett's test, $p < 0.05$), and NOEC $< 0.08 \mu\text{M}$; while Al had NOEC and LOEC of 14.82 (Dunnett's test, $p < 0.05$) and 22.24 (Dunnett's test, $p < 0.05$) μM , respectively. Therefore, Zn was markedly more toxic to *R. subcapitata* than Al, since Zn had, respectively, an IC₅₀ and LOEC about 70-fold and 185 times lower than Al. This could be because, according to MINEQL⁺ analysis, most of the total Zn was in its free form (Zn²⁺) in all test solutions, while Al was complexed as diaspore in test solutions (Table S1, Supplementary material). It is important to note that the resolution of water classification of The National Council for the Environment (CONAMA) recommends concentrations of 0.18 mg L⁻¹ of total Zn (about 7-fold higher than the IC₅₀ obtained in this study for Zn) and 0.1 mg L⁻¹ for dissolved Al, to ensure the protection of aquatic communities (Brazil, 2005).

Table 1. NOEC (no observed effect concentration), LOEC (lowest observed effect concentration) and Inhibition concentration (96h IC₅₀) based on specific growth rates of *Raphidocelis subcapitata* exposed to zinc and aluminum. IC₅₀ are presented by values and standard deviation.

	Zinc		Aluminum	
	($\mu\text{M Zn}$)	(mg Zn L^{-1})	($\mu\text{M Al}$)	(mg Al L^{-1})
NOEC	< 0.08	< 0.005	14.82	0.40
LOEC	0.08	0.005	22.24	0.60
96h IC ₅₀	0.399 ± 0.102	0.026 ± 0.007	27.399 ± 1.156	0.739 ± 0.031

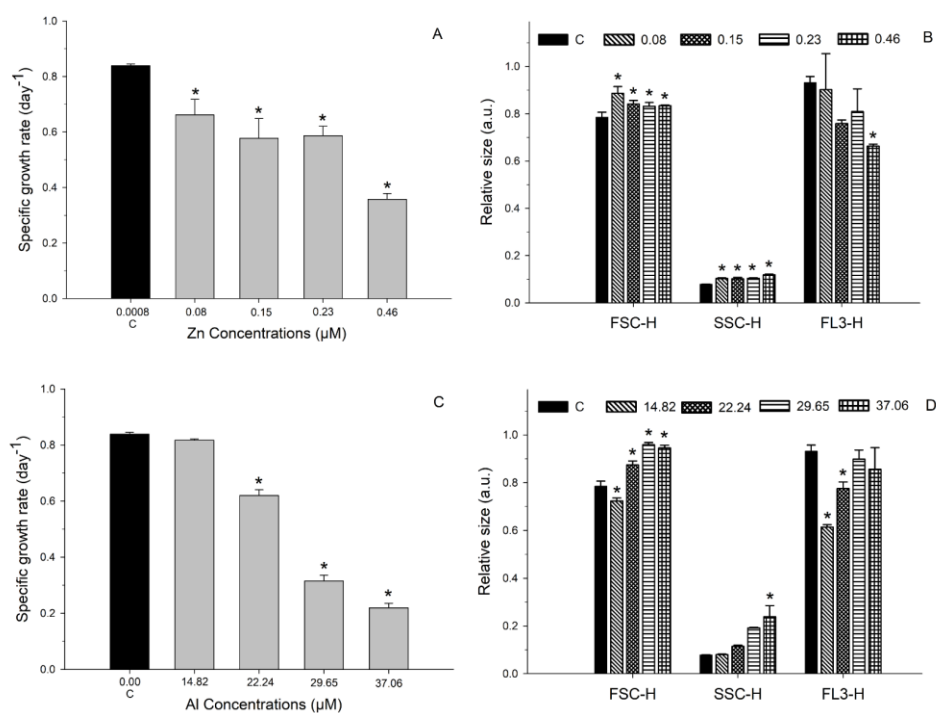


Fig. 2 Specific growth rate (day^{-1}), cell size (FSC-H), cellular complexity (SSC-H) and chlorophyll *a* fluorescence (FL3-H) of *Raphidocelis subcapitata* exposed to zinc (A, B) and aluminum (C, D) during 96h. Metals' concentrations are expressed in μM . Asterisks represent significant differences from control group ($p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Dunnett's post-hoc test; except the SSC-H parameter (Al treatments), analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's post-hoc test).

From Fig. 2b and d, algal cells exposed to Zn increased in size (relative FSC-H) in all concentrations tested with respect to the control group (Dunnett's test, $p < 0.05$); during Al exposure the cells decreased at $14.82 \mu\text{M}$ and increased in the other treatments, indicating that metals probably disturbed the cell division processes. According to previous studies, algae can increase or decrease their cell size when exposed to metals, pesticides and nanoparticles (Leboulanger et al., 2011; Çelekli et al., 2016; Roy et al., 2016; Mansano et al., 2017; Silva et al., 2018; Sousa et al., 2018). The cellular complexity (relative SSC-H) of *R. subcapitata* also increased in all Zn concentrations (Dunnett's test, $p < 0.05$) and at the highest Al concentration ($37.06 \mu\text{M}$) (Dunn's test, $p < 0.05$) (Fig. 2b and d), possibly due to metal internalization. Regarding chlorophyll *a* fluorescence (relative FL3-H), we observed a significant (Dunnett's

test, $p < 0.05$) decrease in fluorescence at $0.46 \mu\text{M}$ of Zn (Fig. 2b), probably indicating that the metal affected the algal photosynthetic apparatus. Regarding the decrease in the fluorescence of chlorophyll *a* during Zn exposure (Fig. 2b), some studies suggest that Zn could replace magnesium in chlorophyll molecule (Cabrita et al., 2018), affecting the oxygen evolution during photosynthesis and generating unstable Chl *a* molecules, which can explain the reduced fluorescence values (Fig. 2b); besides that, there is evidence that Zn can also affect the water-splitting of photosystem II (Van Assche and Clijsters, 1986), affecting photosynthesis. On the other hand, Al significantly decreased (Dunnett's test, $p < 0.05$) the chlorophyll *a* fluorescence at the concentrations of 14.82 and $22.24 \mu\text{M}$, but algae apparently recovered at the concentrations of 29.65 and $37.06 \mu\text{M}$ (Fig. 2d).

After only 5h-exposure, both Zn and Al significantly (Dunnett's test, $p < 0.05$) altered ROS production, with a decrease at $0.46 \mu\text{M}$ Zn (Fig. 3a) and an increase at $37.06 \mu\text{M}$ Al (Fig. 3b). After a 96h-exposure, 0.08 , 0.15 and $0.23 \mu\text{M}$ Zn, *R. subcapitata* cells produced significantly (Dunnett's test, $p < 0.05$) more ROS compared to the control. However, at $0.46 \mu\text{M}$ Zn it was detected less ROS than in the other Zn concentrations, indeed not differing statistically from the control (Fig. 3). In a previous study with *R. subcapitata*, we also observed less intracellular ROS when exposed to higher Cd concentrations than in lower concentrations (Alho et al., 2019). It probably occurs because algae have antioxidant mechanisms such as enzymes (e.g. superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase) or compounds with low molecular weight (Pinto et al., 2003), which allows the algae to decrease intracellular ROS content. With regards to Al, after 96h-exposure *R. subcapitata* cells produced significantly more ROS (Dunnett's test, $p < 0.05$) in all concentrations tested compared to control, and actually the greater Al concentration the greater the ROS production increased. Indeed, at the highest Al concentration ($37.06 \mu\text{M}$) the algal cells doubled the ROS production compared to the lowest Al concentration ($14.82 \mu\text{M}$). It is interesting to point out that at the

highest Al concentration, the cell size increase (1.2-fold) was proportionally lower than the ROS increase (3-fold). In fact, ROS molecules can interact with fatty acids from cell membrane, causing lipidic peroxidation (Vavilin et al., 1998). Since we observed that the greater the ROS production, the lower the growth rate, we hypothesized that ROS played a major role on the algal growth inhibition.

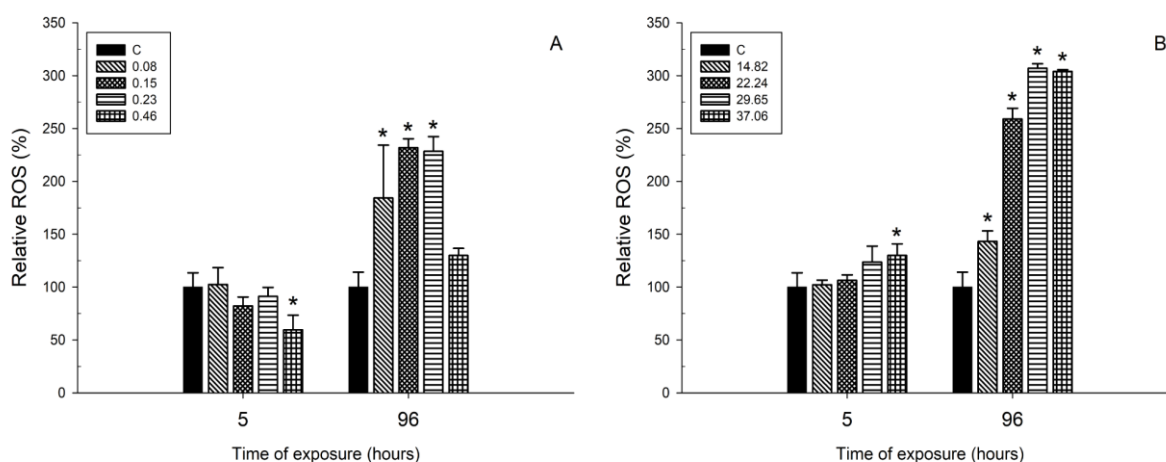


Fig. 3 Cellular reactive oxygen species (ROS) produced by *Raphidocelis subcapitata* exposed to zinc (A) and aluminum (B) during 5 and 96 h. Metal concentrations are expressed in μM . Asterisks represent significant differences from the control group ($p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Dunnett's post-hoc test).

Based on isolated metal toxicity to *R. subcapitata*, we obtained that Zn affected more the chlorophyll *a* fluorescence at the highest concentration, suggesting impairments of photosynthetic apparatus, however algae exposed to the highest Zn concentration produced less ROS than in the lower concentrations, suggesting a possible recovery. On the other hand, we observed the opposite for Al, since its exposure to *R. subcapitata* led to a higher ROS production, although the chlorophyll *a* fluorescence was not affected at the highest concentration.

3.2. SSD analysis

According to SSD curves (Fig. 4) constructed based on the literature data (Tables S2 and S3, Supplementary material), *R. subcapitata* was the most sensitive organism for Zn, and was more sensitive than the algae *Chlorella* sp (Fig. 4a). Moreover, for Al *R. subcapitata* was less sensitive than *Stichococcus* sp and more sensitive than the algae *Monoraphidium dybowskii*, *Desmodesmus subspicatus* and *Chlorella vulgaris* (Fig. 4b). The HC₅ and HC₅₀ for Zn were, respectively, 0.062 (0.021-0.137) and 1.287 (0.708-2.338) mg Zn L⁻¹; while for Al, HC₅ and HC₅₀ were, respectively, 0.148 (0.042-0.350) and 2.878 (1.473-5.620) mg Al L⁻¹. Therefore, according to HC₅ and HC₅₀ values for Zn, *R. subcapitata* would not be protected; while with respect to Al, the algae would be protected only to HC₅, but not to HC₅₀. Currently, the acceptable Zn and Al levels in water by CONAMA are 0.18 mg Zn L⁻¹ and 0.1 Al mg L⁻¹ (Brazil, 2005), while maximum acceptable levels by USEPA (criterion continuous concentration, CCC) are 0.12 mg Zn L⁻¹ (USEPA, 1995) and 0.38 mg Al L⁻¹ (USEPA, 2018). Therefore, for Zn both recommendations would protect 50% of species according to HC₅₀ (Table 1), but not the 5% (HC₅), including *R. subcapitata*; while for Al, USEPA CCC would protect 50% of the species (including *R. subcapitata*), but not ensuring the 5% of species.

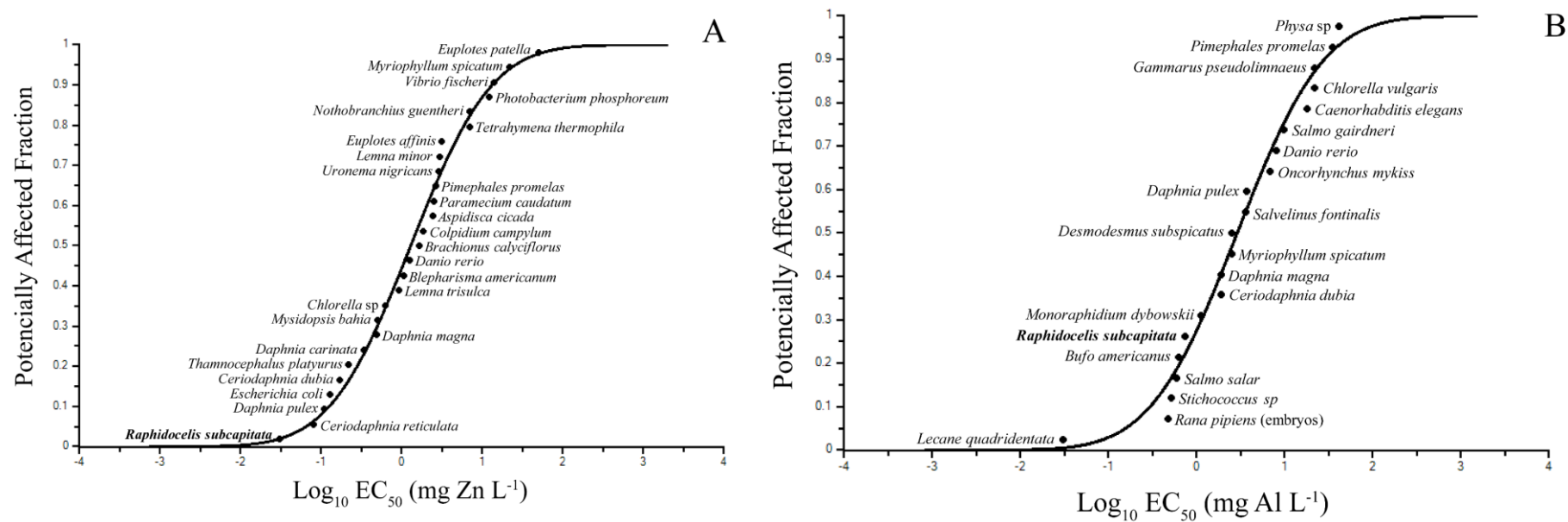


Fig. 4 Species sensitivity distribution (SSD) based on EC₅₀ values (mg metal L⁻¹) of aquatic organisms, obtained from scientific literature (Tables S2 and S3, Supplementary material), exposed to zinc (A) and aluminum (B). Data of the present study (*Raphidocelis subcapitata*) are in bold.

3.3. Mixture toxicity

The data from the mixture toxicity test (96 h specific growth rates) modeled using the MIXTOX tool are available in Table 2. In the present study, both CA and IA models were statistically validated, although the CA model better explained the mixture data between Zn and Al. For the CA model, the SS (sum of squared residuals) was initially 0.07 ($p = 1.44 \times 10^{-6}$; $r^2 = 0.79$). The “a” parameter was added in S/A (synergism/antagonism) deviation, and then SS decreased to 0.05 ($p = 0.002$; $r^2 = 0.85$). In DR (dose ratio-dependent) deviation, after adding “a” and “b_{DR}” parameters, SS remained 0.05, although with no significance ($p = 0.18$; $r^2 = 0.86$). In DL (dose level-dependence), SS was 0.04 ($p = 0.02$; $r^2 = 0.88$) (Table 2) and was the best deviation for the CA model (Fig. 5b). Regarding the IA model: initially, the SS was 0.11 ($p = 9.69 \times 10^{-5}$; $r^2 = 0.68$). After that, when the “a” parameter was added in S/A deviation, the SS decreased to 0.09 ($p = 0.02$; $r^2 = 0.73$). In the DR deviation, we added “a” and “b_{DR}” parameters, the SS decreased to 0.08, but there was no significance ($p = 0.06$, $r^2 = 0.77$). It was observed that in DL deviation that SS decreased to 0.05 ($p = 3.85 \times 10^{-5}$, $r^2 = 0.86$) and was the best fitting model, explaining 86% of the data variation (Fig. 5a). Our results corroborate the IA model from MIXTOX, since from the data obtained in the present study, Zn affected more the fluorescence of chlorophyll *a*, while Al induced damage probably due to oxidative damage by ROS production.

Table 2. Summary of modeled data of specific growth rates of *Raphidocelis subcapitata* exposed to mixtures of zinc (Zn) and aluminum (Al) during 96 h. Values were obtained by the MIXTOX tool (Jonker et al., 2005). Max = maximum response value, β = slope response of isolated compounds, IC_{50} = median growth inhibition concentration; a and $b_{DR/DL}$ = function parameters; SS = sum of the squared residuals; r^2 = regression coefficient; χ^2 or F test = statistical test; df = degrees of freedom; p (χ^2/F) = level of significance of statistical test; CA = concentration addition model; IA = independent action model; S/A = synergism/antagonism deviation; DR = dose ratio-dependent deviation; DL = dose level-dependent deviation.

	Concentration addition				Independent action			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
Max	0.87	0.86	0.86	0.85	0.80	0.86	0.85	0.86
β Zn	0.42	0.64	0.73	0.89	0.68	0.65	0.25	0.96
β Al	3.27	4.06	3.91	4.42	3.06	2.54	2.89	3.97
IC_{50} for Zn	0.71	0.43	0.35	0.39	0.67	0.37	1.80	0.34
IC_{50} for Al	28.30	27.10	27.30	27.33	32.00	28.38	28.68	27.43
a	-	1.20	0.46	-0.18	-	1.21	5.44	-3.05
$b_{DR/DL}$	-	-	2.37	5.58	-	-	-20.77	2.20
SS	0.07	0.05	0.05	0.04	0.11	0.09	0.08	0.05
r^2	0.79	0.85	0.86	0.88	0.68	0.73	0.77	0.86
χ^2 or F test	18.87	9.11	1.80	5.47	10.46	4.98	3.42	16.94
Df	-	1.00	1.00	1.00	-	1.00	1.00	1.00
p (χ^2/F)	1.44×10^{-6}	0.0025	0.1797	0.0193	9.69×10^{-5}	0.0256	0.0644	3.85×10^{-5}

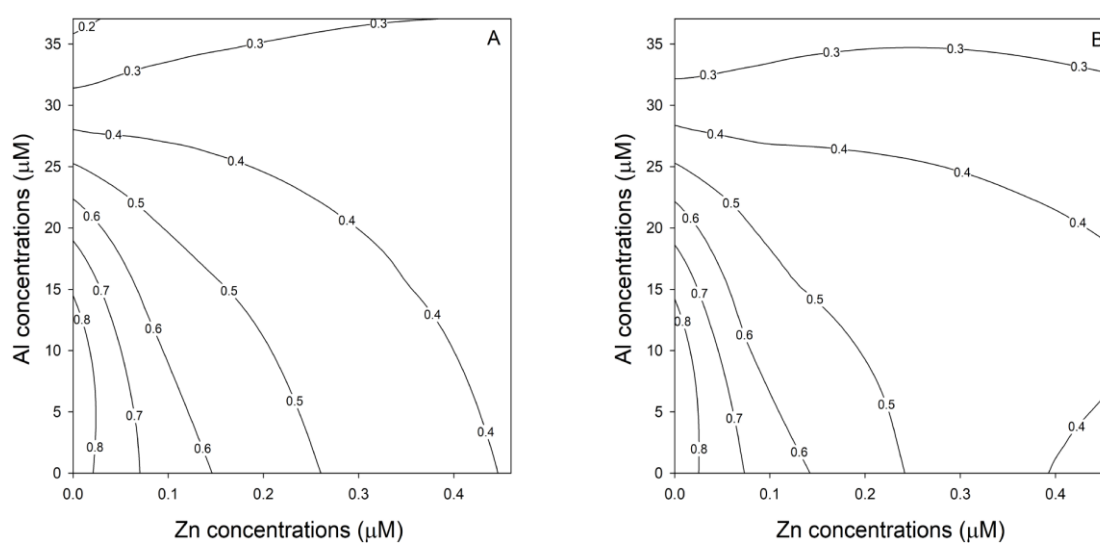


Fig. 5 Isobolograms of specific growth rates of *Raphidocelis subcapitata* exposed to zinc and aluminum mixtures, following the concentration addition (A) and independent action (B) models, both from dose level-dependence (DL) deviation. Linear lines demonstrate no interaction, while concave and convex shapes represent, respectively, synergism and antagonism (Alloatti et al., 2013).

Therefore, we found that the mixtures between Zn and Al were dose level-dependent, with synergism in lower concentrations and antagonism in higher concentrations ($a < 0$), and the change from synergism to antagonism occurred at a lower dose-level than the IC_{50} ($b_{DR} > 2$) (Table 2). Based on that, it is important to note that concentrations below $0.026 \text{ mg Zn L}^{-1}$ and $0.739 \text{ mg Al L}^{-1}$ had a synergic toxicity effect, thus synergism may occur in natural environments usually containing low metal concentrations. Concentrations of Zn and Al may vary depending on the location site, e.g.: $11.6 \text{ } \mu\text{g Zn L}^{-1}$ (Pardo river, Brazil; Alves et al. (2014)), $260 \text{ } \mu\text{g Zn L}^{-1}$ (Buriganga river, Bangladesh; Mohiuddin et al. (2011)), $57 \text{ } \mu\text{g Al L}^{-1}$ (Yarmouk river, Jordan; Batayneh (2012)) and $52.07 \text{ } \mu\text{g Al L}^{-1}$ (mean value for 113 lakes, USA; Warby et al. (2008)). Therefore, legislation should take into account the interactions between compounds in order to adjust the recommended maximum level of metals in natural waters. The algae, primary producers, are at the base of the food webs, and effects in this trophic level could disturb organisms from higher trophic levels. *R. subcapitata* is a good model to represent the green algae in policies regarding mixtures, since it is a standardized test organism. However, it is important to note that we believe that environmental policies should take into account the

toxicity of several aquatic organisms from distinct trophic levels, in order to be representative and ensure the protection of the most sensitive organisms. According to our SSD curves (Fig. 4), *R. subcapitata* is a sensitive organism; besides that, we found synergistic effects before EC₅₀, enhancing the metals' toxicity.

Very few studies addressed the toxicity of Zn-Al mixtures to aquatic organisms (e.g. Roy and Campbell, 1995) and the existing studies do not address recent mixture modeling techniques. Although there is a lack of knowledge with respect to Zn and Al mixtures to freshwater organisms, the mixtures of Zn with other metals were assessed on some organisms. For the algae *Chlorella* sp, Zn-Cu and Zn-Cd mixtures had antagonistic effects (Franklin et al., 2002), while Zn-Ni had synergic effects to the algae *Navicula pelliculosa* (Nagai and De Schampelaere, 2016). In Al-Pb mixtures to algae *Dunaliella tertiolecta*, synergism was observed on the cell membrane (Saçan et al., 2007). Regarding animals, mixtures of Zn-Cu and Zn-Pb had, respectively, synergistic and antagonistic effects to the cladoceran *Daphnia carinata* (Cooper et al., 2009), while Zn-Ni mixtures had noninteractive and synergistic effects to *Daphnia magna* (Nys et al., 2015); Zn-Cd mixtures presented synergism to white shrimp *Penaeus setiferus* (Vanegas et al., 1997); and Zn-Cu and Zn-Cd mixtures had, respectively, antagonistic and additive effects to the salmon *Oncorhynchus tshawyts* (Finlayson and Verrue, 1982).

4. Conclusions

In general, Zn was more toxic to *R. subcapitata* than Al according to the growth parameter. Moreover, Zn affected more chlorophyll *a* fluorescence, while Al induced more intracellular ROS production. In joint treatments, metal toxicity data best fitted the concentration addition model and dose level-dependent deviation. Metals had synergic effects at low doses (environmental concentrations) and antagonistic effects at high doses. Synergic

effects at environmental concentrations are of high concern, since the predictable impacts for the aquatic organisms based on the isolated compounds would underestimate the mixture toxicity effects.

Acknowledgements

We thank Dr. Hugo Sarmento for the help with flow cytometry analyses. The authors are grateful for the financial support grants # 2014/14139-3, 2016/00753-7 and 2018/07988-5, São Paulo Research Foundation (FAPESP). MGGM thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) for the scholarship granted (process number 305229/2016-8). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Declarations of interest

none.

References

- Aldenbergh, T., Jaworska, J.S., 2000. Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 1-18.
- Alho, L.O.G., Gebara, R.C., Paina, K.A., Sarmento, H., Melao, M.G.G., 2019. Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169, 950-959.
- Alloatti, A., Tripodi, K.E., Uttaro, A.D., 2013. Synergistic effect of inhibitors of fatty acid desaturases on *Trypanosoma parasites*. *Parasitology Research* 112, 3289–3294.
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., 2013. Simplifying complexity: Mixture toxicity assessment in the last 20 years. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 1685-1687.

Alves, R.I., Sampaio, C.F., Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., Segura-Munoz, S.I., 2014. Metal concentrations in surface water and sediments from Pardo River, Brazil: human health risks. *Environmental Research* 133, 149-155.

Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment* 407, 1461-1468.

Batayneh, A.T., 2012. Toxic (aluminum, beryllium, boron, chromium and zinc) in groundwater: health risk assessment. *International Journal of Environmental Science and Technology* 9, 153-162.

Bianchi, E., Dalzochio, T., Simões, L.A.R., Rodrigues, G.Z.P., da Silva, C.E.M., Gehlen, G., do Nascimento, C.A., Spilki, F.R., Ziulkoski, A.L., da Silva, L.B., 2019. Water quality monitoring of the Sinos River Basin, Southern Brazil, using physicochemical and microbiological analysis and biomarkers in laboratory-exposed fish. *Ecology and Hydrobiology* 19, 328-338.

Blaise, C., Legault, R., Bermingham, N., Van Coillie, R., Vasseur, P., 1986. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxicity Assessment* 1, 261-281.

Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M., Kahru, A., 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution* 158, 41-47.

Brazil - Ministry of the Environment. National Environmental Council - CONAMA, 2005. Resolution n. 357/2005, March 17th. Brasília, DF, 7 pp.

Cabrita, M.T., Duarte, B., Gameiro, C., Godinho, R.M., Caçador, I., 2018. Photochemical features and trace element substituted chlorophylls as early detection biomarkers of metal exposure in the model diatom *Phaeodactylum tricoratum*. *Ecological Indicators* 95, 1038-1052.

Callewaert, C., Hutapea, P., Van de Wiele, T., Boon, N., 2014. Deodorants and antiperspirants affect the axillary bacterial community. *Archives of Dermatological Research* 306, 701-710.

Carvalho, M.S., Moreira, R.M., Ribeiro, K.D., Almeida, A.M.d., 2017. Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. *Acta Brasiliensis* 1, 37-41.

Çelekli, A., Gültekin, E., Bozkurt, H., 2016. Morphological and Biochemical Responses of *Spirogyra setiformis* Exposed to Cadmium. *CLEAN - Soil, Air, Water* 44, 256-262.

Cooper, N.L., Bidwell, J.R., Kumar, A., 2009. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1523-1528.

Cruz, A.C.F., Gusso-Choueri, P., Araujo, G.S., Campos, B.G., Abessa, D.M.S., 2019. Levels of metals and toxicity in sediments from a Ramsar site influenced by former mining activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 171, 162-172.

- Eisentraeger, A., Dott, W., Klein, J., Hahn, S., 2003. Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 346-354.
- Eisler, R. - 1993. *Zinc Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review*. Laurel, Maryland, 126 pp.
- Exley, C., House, E.R., 2011. Aluminium in the human brain. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* 142, 357-363.
- Fernandes, G.W., Goulart, F.F., Ranieri, B.D., Coelho, M.S., Dales, K., Boesche, N., Bustamante, M., Carvalho, F.A., Carvalho, D.C., Dirzo, R., Fernandes, S., Galetti, P.M., Millan, V.E.G., Mielke, C., Ramirez, J.L., Neves, A., Rogass, C., Ribeiro, S.P., Scariot, A., Soares-Filho, B., 2016. Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza & Conservação* 14, 35-45.
- Finlayson, B.J., Verrue, K.M., 1982. Toxicities of Copper, Zinc, and Cadmium Mixtures to Juvenile Chinook Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 111, 645-650.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., Petocz, P., 2002. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2412-2422.
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A., 2000. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Science of the Total Environment* 247, 119-126.
- Gostomski, F., 1990. The toxicity of aluminum to aquatic species in the US. *Environmental Geochemistry and Health* 12, 51-54.
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1972-1978.
- Guzmán, F.T., Gonzalez, F.J., Martinez, R.R., 2010. Implementing *Lecane quadridentata* acute toxicity tests to assess the toxic effects of selected metals (Al, Fe and Zn). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 287-295.
- Hong, Y., Hu, H.Y., Xie, X., Sakoda, A., Sagehashi, M., Li, F.M., 2009. Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* 91, 262-269.
- Hsieh, C.-Y., Tsai, M.-H., Ryan, D.K., Pancorbo, O.C., 2004. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the Microtox® chronic toxicity test. *The Science of the Total Environment* 320, 37-50.
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance Testing of Synergistic/Antagonistic, Dose Level-Dependent, or Dose Ratio-Dependent

Effects in Mixture Dose–Response Analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2701-2713.

Lam, S.-M., Sin, J.-C., Abdullah, A.Z., Mohamed, A.R., 2012. Degradation of wastewaters containing organic dyes photocatalysed by zinc oxide: a review. *Desalination and Water Treatment* 41, 131-169.

Leboulanger, C., Bouvy, M., Carre, C., Cecchi, P., Amalric, L., Bouchez, A., Pagano, M., Sarazin, G., 2011. Comparison of the effects of two herbicides and an insecticide on tropical freshwater plankton in microcosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61, 599-613.

Lopes, N.P., Freitas, R.P.d., Filho, R.C.R., 2019. How Many More Brumadinhos and Marianas Will We be Faced with Yet? *Journal of the Brazilian Chemical Society* 30, 681-682.

Madoni, P., Romeo, M.G., 2006. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environmental Pollution* 141, 1-7.

Mansano, A.S., Moreira, R.A., Dornfeld, H.C., Freitas, E.C., Vieira, E.M., Sarmiento, H., Rocha, O., Selegim, M.H.R., 2017. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 312-321.

Meyer, J.S., Farley, K.J., Garman, E.R., 2015. Metal mixtures modeling evaluation project: 1. Background. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, 726-740.

Mohiuddin, K.M., Ogawa, Y., Zakir, H.M., Otomo, K., Shikazono, N., 2011. Heavy metals contamination in water and sediments of an urban river in a developing country. *International Journal of Environmental Science & Technology* 8, 723-736.

Moral, R.d.A., Hinde, J., Demetrio, C.G.B., 2018. Package ‘hnp’: Half-Normal Plots with Simulation Envelopes, vers. 1.2-6. Available in: <https://cran.r-project.org/web/packages/hnp/index.html>.

Nagai, T., De Schampelaere, K.A., 2016. The effect of binary mixtures of zinc, copper, cadmium, and nickel on the growth of the freshwater diatom *Navicula pelliculosa* and comparison with mixture toxicity model predictions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 2765-2773.

Nalewajko, C., O'Mahony, M.A., 1989. Photosynthesis of algal cultures and phytoplankton following an acid pH shock. *Journal of Phycology* 25, 319-325.

Naumann, B., Eberius, M., Appenroth, K.J., 2007. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. *Journal of Plant Physiology* 164, 1656-1664.

Nelson, S.M., Roline, R.A., 1998. Evaluation of the Sensitivity of Rapid Toxicity Tests Relative to Daphnid Acute Lethality Tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 292-299.

- Nys, C., Asselman, J., Hochmuth, J.D., Janssen, C.R., Blust, R., Smolders, E., De Schamphelaere, K.A., 2015. Mixture toxicity of nickel and zinc to *Daphnia magna* is noninteractive at low effect sizes but becomes synergistic at high effect sizes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, 1091-1102.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development, 2002. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. 21 pp.
- Okamoto, A., Yamamuro, M., Tatarazako, N., 2015. Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology* 35, 824-830.
- Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., Bolzinger, M.-A., 2014. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 457, 263-274.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P., 2003. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae. *Journal of Phycology* 39, 1008-1018.
- R Development Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available in: <http://www.R-project.org>.
- Rai, R., Agrawal, M., Agrawal, S.B., 2016. Impact of heavy metals on physiological processes of plants: with special reference to photosynthetic system. in: al., A.S.e. (Ed.). *Plant Responses to Xenobiotics*. Springer Nature Singapore pp. 127-140.
- Roy, R., Campbell, P.G.C., 1995. Survival time modeling of exposure of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*) to mixtures of aluminum and zinc in soft water at low pH. *Aquatic Toxicology* 33, 155-176.
- Roy, R., Parashar, A., Bhuvaneshwari, M., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2016. Differential effects of P25 TiO₂ nanoparticles on freshwater green microalgae: *Chlorella* and *Scenedesmus* species. *Aquatic Toxicology* 176, 161-171.
- Saçan, M.T., Oztay, F., Bolkent, S., 2007. Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to lead and aluminum: toxicity and effects on ultrastructure. *Biological Trace Element Research* 120, 264-272.
- Santos-Medrano, G.E., Rico-Martínez, R., 2015. Acute and chronic effects of five metals in a battery of freshwater planktonic organisms. *Fresenius Environmental Bulletin* 24, 4658-4666.
- Sarmiento, H., Unrein, F., Isumbisho, M., Stenuite, S., Gasol, J.M., Descy, J.-P., 2008. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biology* 53, 756-771.
- Shedd, T.R., Widder, M.W., Toussaint, M.W., Sunkel, M.C., Hull, E., 1999. Evaluation of the annual killifish *Nothobranchius guentheri* as a tool for rapid acute toxicity screening. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2258-2261.

Shuhaimi-Othman, M., Nur-Amalina, R., Nadzifah, Y., 2012. Toxicity of metals to a freshwater snail, *Melanoides tuberculata*. *The Scientific World Journal* 2012, 1-10.

Silva, C.P., Silveira, E.L., Campos, S.X., 2017. Environmental pollution by heavy metals in the São João River basin, southern Brazil. *Environmental Earth Sciences* 76, 1-10.

Silva, D., Bellato, C., Marques Neto, J., Fontes, M., 2018. Arsenic and trace metals in water and sediment of the Velhas River, Southeastern Iron Quadrangle Region, Minas Gerais, Brazil. *Química Nova* 49, 1011-1018.

Silva, Y.J.A.B.d., Cantalice, J.R.B., Singh, V.P., Nascimento, C.W.A.d., Wilcox, B.P., Silva, Y.J.A.B.d., 2019. Heavy metal concentrations and ecological risk assessment of the suspended sediments of a multi-contaminated Brazilian watershed. *Acta Scientiarum Agronomy* 41, e42620.

Soni, M.G., White, S.M., Flamm, W.G., Burdock, G.A., 2001. Safety evaluation of dietary aluminum. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 33, 66-79.

Sousa, C.A., Soares, H.M.V.M., Soares, E.V., 2018. Toxic effects of nickel oxide (NiO) nanoparticles on the freshwater alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology* 204, 80-90.

Souza, A.M., Salviano, A.M., Melo, J.F., Felix, W.P., Belem, C.S., Ramos, P.N., 2016. Seasonal study of concentration of heavy metals in waters from lower Sao Francisco River basin, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 76, 967-974.

Stanley, R.A., 1974. Toxicity of heavy metals and salts to eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2, 331-341.

Toussaint, M.W., Shedd, T.R., van der Schalie, W.H., Leather, G.R., 1995. A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 907-915.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 1995. Water Quality Criteria Documents for the Protection of Aquatic Life in Ambient Water. Washington D.C., USA, pp.

USEPA - U. S. Environmental Protection Agency, 2007. Framework for metal risk assessment EPA 120/R-07/001. Washington, DC, 172 pp pp.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2012. Ecological Effects Test Guidelines. OCSPP 850.4500: Algal Toxicity. 26 pp.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2018. Final Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Aluminum. Washington D.C., USA, 161 pp.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2019. National recommended water quality criteria, aquatic life criteria table. Available in: <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>

USGS - U.S. Geological Survey, 2019a. Mineral Commodity Summaries - Aluminum. Available in: <https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/aluminum/mcs-2019-alumi.pdf>

USGS - U.S. Geological Survey, 2019b. Mineral Commodity Summaries - Zinc. Available in: <https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/zinc/mcs-2019-zinc.pdf>

Van Assche, F., Clijsters, H., 1986. Inhibition of Photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by Treatment with Toxic Concentration of Zinc: Effect on Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/ Oxygenase. *Journal of Plant Physiology* 125, 355-360.

Van Vlaardingen, P., Traas, T.P., Wintersen, A.M., Aldenberg, T. - 2004. ETX 2.0. A Program to Calculate Hazardous Concentrations and Fraction Affected, Based on Normally Distributed Toxicity Data. RIVM Report No. 601501028/2004. Available in: <https://rivm.openrepository.com/handle/10029/256981>

Vanegas, C., Espina, S., Botello, A.V., Villanueva, S., 1997. Acute Toxicity and Synergism of Cadmium and Zinc in White Shrimp, *Penaeus setiferus*, Juveniles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 87-92.

Vavilin, D.V., Ducruet, J.-M., Matorin, D.N., Venediktov, P.S., Rubin, A.B., 1998. Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 42, 233-239.

Wah Chu, K., Chow, K.L., 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquatic Toxicology* 61, 53-64.

Wang, W.-X., 2012. Dietary toxicity of metals in aquatic animals: Recent studies and perspectives. *Chinese Science Bulletin* 58, 203-213.

Warby, R.A.F., Johnson, C.E., Driscoll, C.T., 2008. Changes in Aluminum Concentrations and Speciation in Lakes Across the Northeastern U.S. Following Reductions in Acidic Deposition. *Environmental Science & Technology* 42, 8668-8674.

Weber, P., Behr, E.R., Knorr, C.D.L., Vendruscolo, D.S., Flores, E.M.M., Dressler, V.L., Baldisserotto, B., 2013. Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchemical Journal* 106, 61-66.

Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L., 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 174-185.

Supplementary material

Figure S1. Zinc and aluminum determination by ICP-OES. Quantification was grouped by treatments with same nominal metal concentration. For zinc (A): sample 1 = T1, T9, T10, T11 and T12; 2 = T2, T13, T14, T15, T16; 3 = T3, T17, T18, T19, T20; 4 = T4, T21, T22, T23, T24. For aluminum (B): sample 1 = T5, T9, T13, T17, T21; 2 = T6, T10, T14, T18, T22; 3 = T7, T11, T15, T19, T23; 4 = T8, T12, T16, T20, T24. Treatments' acronyms are available in the manuscript (Fig. 1).

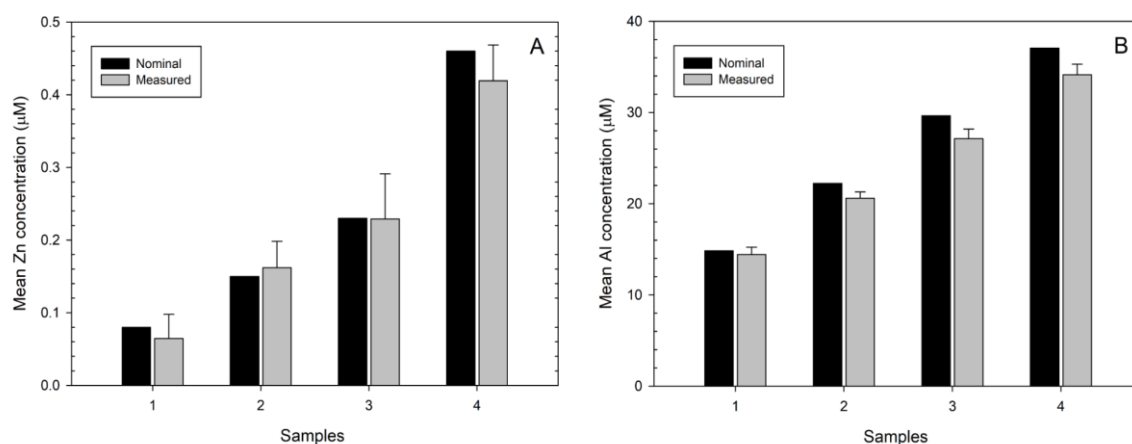


Table S1: Zinc (Zn) and aluminum (Al) speciation in test solutions, predicted by the MINEQL⁺ software.

Total Zn added (μM)	Zn ²⁺ (μM)	Total Al added (μM)	Al ³⁺ (μM)	Diaspore (μM)
0.08	0.078	14.82	7.33×10^{-8}	14.80
0.15	0.147	22.24	7.33×10^{-8}	22.20
0.23	0.225	25.65	7.33×10^{-8}	29.70
0.46	0.451	37.06	7.33×10^{-8}	37.06

Table S2. Toxicity data of aquatic organisms exposed to zinc (datum of the present study is in bold), obtained from scientific studies.

Group	Species	Endpoint	Endpoint value (mg Zn L ⁻¹)	References
Algae	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	96h IC₅₀	0.03	Present study
Crustacean	<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	48h LC ₅₀	0.08	Mount and Norberg (1984)
Crustacean	<i>Daphnia pulex</i>	48h LC ₅₀	0.11	Mount and Norberg (1984)
Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	2-3h EC ₅₀	0.13	Nelson and Roline (1998)
Crustacean	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48h LC ₅₀	0.17	Cooper et al. (2009)
Crustacean	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24h LC ₅₀	0.22	Blinova et al. (2010)
Crustacean	<i>Daphnia carinata</i>	48h LC ₅₀	0.34	Cooper et al. (2009)
Crustacean	<i>Daphnia magna</i>	48h EC ₅₀ / LC ₅₀	0.49*	Blinova et al. (2010), Oda et al. (2006), Toussaint et al. (1995)
Crustacean	<i>Mysidopsis bahia</i>	96h LC ₅₀	0.50	Toussaint et al. (1995)
Algae	<i>Chlorella</i> sp	48h IC ₅₀	0.63	Wilde et al. (2006)
Macrophyte	<i>Lemna trisulca</i>	14-day EC ₅₀	0.91	Huebert and Shay (1992)
Protozoan	<i>Blepharisma americanum</i>	24h LC ₅₀	1.05	Madoni et al. (1992)
Fish	<i>Danio rerio</i>	96h LC ₅₀	1.24**	Zhu et al. (2008)
Rotifer	<i>Brachionus calyciflorus</i>	24h LC ₅₀	1.66	Nelson and Roline (1998)
Protozoan	<i>Colpidium campylum</i>	24h LC ₅₀	1.85	Madoni et al. (1992)
Protozoan	<i>Aspidisca cicada</i>	24h LC ₅₀	2.40	Madoni et al. (1992)
Protozoan	<i>Paramecium caudatum</i>	24h LC ₅₀	2.50	Madoni et al. (1992)
Fish	<i>Pimephales promelas</i>	96h LC ₅₀	2.65	Toussaint et al. (1995)
Protozoan	<i>Uronema nigricans</i>	24h LC ₅₀	2.90	Madoni et al. (1992)
Macrophyte	<i>Lemna minor</i>	7-day EC ₅₀	2.97*	Drost et al. (2007), Ince et al. (1999), Naumann et al. (2007)
Protozoan	<i>Euplotes affinis</i>	24h LC ₅₀	3.10	Madoni et al. (1992)
Protozoan	<i>Tetrahymena thermophila</i>	24h EC ₅₀	6.90*	Blinova et al. (2010), Mortimer et al. (2010)
Fish	<i>Nothobranchius guentheri</i>	24h EC ₅₀ / LC ₅₀	7.06*	Shedd et al. (1999)
Bacteria	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	5min EC ₅₀	12.00	Toussaint et al. (1995)
Bacteria	<i>Vibrio fischeri</i>	5min EC ₅₀	13.80	Nelson and Roline (1998)
Macrophyte	<i>Myriophyllum spicatum</i>	32-day IC ₅₀	21.60	Stanley (1974)
Protozoan	<i>Euplotes patella</i>	24h LC ₅₀	50.00	Madoni et al. (1992)

* For species with more than one available endpoint data on literature, the geometric means were calculated.

** The original LC₅₀ value (mg L⁻¹) was recalculated to zinc-based (mg Zn L⁻¹).

Table S3. Toxicity data of aquatic organisms exposed to aluminum (datum of the present study is in bold), obtained from scientific studies.

Group	Species	Endpoint	Endpoint value (mg Al L ⁻¹)	References
Rotifer	<i>Lecane quadridentata</i>	48h LC ₅₀	0.03**	Guzmán et al. (2010)
Frog	<i>Rana pipiens</i> (embryos)	LC ₅₀	0.47	Freda et al. (1990)
Algae	<i>Stichococcus sp</i>	EC ₅₀	0.52	Claesson and Törnqvist (1988)
Fish	<i>Salmo salar</i>	96h LC ₅₀	0.59*	Hamilton and Haines (1995)
Frog	<i>Bufo americanus</i>	96h LC ₅₀	0.63	Freda et al. (1990)
Algae	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	96h EC₅₀	0.74	Present study
Algae	<i>Monoraphidium dybowskii</i>	EC ₅₀	1.11	Claesson and Törnqvist (1988)
Crustacean	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	EC ₅₀ / LC ₅₀	1.90	Gostomski (1990)
Crustacean	<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ / LC ₅₀	1.90*	Biesinger and Christensen (1972), Okamoto et al. (2015)
Macrophyte	<i>Myriophyllum spicatum</i>	32-day IC ₅₀	2.50	Stanley (1974)
Algae	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72h EC ₅₀	2.53* **	Eisentraeger et al. (2003)
Fish	<i>Salvelinus fontinalis</i>	EC ₅₀ / LC ₅₀	3.60	Gostomski (1990)
Crustacean	<i>Daphnia pulex</i>	48h LC ₅₀	3.65	Griffitt et al. (2008)
Fish	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96h LC ₅₀	6.71*	Gundersen et al. (1994)
Fish	<i>Danio rerio</i>	48h LC ₅₀	7.92	Griffitt et al. (2008)
Fish	<i>Salmo gairdneri</i>	EC ₅₀ / LC ₅₀	9.76*	Gostomski (1990)
Nematode	<i>Caenorhabditis elegans</i>	48h LC ₅₀	18.15	Wah Chu and Chow (2002)
Algae	<i>Chlorella vulgaris</i>	15-day LC ₅₀	21.83**	Rai (1998)
Amphipod	<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	EC ₅₀ / LC ₅₀	22.00	Gostomski (1990)
Fish	<i>Pimephales promelas</i>	EC ₅₀ / LC ₅₀	35.00	Gostomski (1990)
Snail	<i>Physa sp</i>	EC ₅₀ / LC ₅₀	41.02*	Gostomski (1990)

* For species with more than one available endpoint data on literature, the geometric means were calculated.

** The original EC₅₀ / LC₅₀ value (mg L⁻¹) was recalculated to aluminum-based (mg Al L⁻¹)

References

- Biesinger, K.E., Christensen, G.M., 1972. Effects of Various Metals on Survival, Growth, Reproduction, and Metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29, 1691-1700.
- Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M., Kahru, A., 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution* 158, 41-47.
- Claesson, A., Törnqvist, L., 1988. The toxicity of aluminium to two acido-tolerant green algae. *Water Research* 22, 977-983.
- Cooper, N.L., Bidwell, J.R., Kumar, A., 2009. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72, 1523-1528.
- Drost, W., Matzke, M., Backhaus, T., 2007. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere* 67, 36-43.
- Eisentraeger, A., Dott, W., Klein, J., Hahn, S., 2003. Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 346-354.
- Freda, J., Cavdek, V., McDonald, D.G., 1990. Role of Organic Complexation in the Toxicity of Aluminum to *Rana pipiens* Embryos and *Bufo americanus* Tadpoles. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, 217-224.
- Gostomski, F., 1990. The toxicity of aluminum to aquatic species in the US. *Environmental Geochemistry and Health* 12, 51-54.
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1972-1978.
- Gundersen, D.T., Bustaman, S., Seim, W.K., Curtis, L.R., 1994. pH, Hardness, and Humic Acid Influence Aluminum Toxicity to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Weakly Alkaline Waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 1345-1355.
- Guzmán, F.T., Gonzalez, F.J., Martinez, R.R., 2010. Implementing *Lecane quadridentata* acute toxicity tests to assess the toxic effects of selected metals (Al, Fe and Zn). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 287-295.
- Hamilton, S.J., Haines, T.A., 1995. Influence of fluoride on aluminum toxicity to Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 2432-2444.
- Huebert, D.B., Shay, J.M., 1992. Zinc toxicity and its interaction with cadmium in the submerged aquatic macrophyte *Lemna trisulca* L. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 715-720.
- Ince, N.H., Dirilgen, N., Apikyan, I.G., Tezcanli, G., Üstün, B., 1999. Assessment of Toxic Interactions of Heavy Metals in Binary Mixtures: A Statistical Approach. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 365-372.
- Madoni, P., Esteban, G., Gorbi, G., 1992. Acute toxicity of cadmium, copper, mercury, and zinc to ciliates from activated sludge plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 49, 900-906.

- Mortimer, M., Kasemets, K., Kahru, A., 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology* 269, 182-189.
- Mount, D.I., Norberg, T.J., 1984. A seven-day life cycle cladoceran toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3, 425-434.
- Naumann, B., Eberius, M., Appenroth, K.J., 2007. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. *Journal of Plant Physiology* 164, 1656-1664.
- Nelson, S.M., Roline, R.A., 1998. Evaluation of the Sensitivity of Rapid Toxicity Tests Relative to Daphnid Acute Lethality Tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 292-299.
- Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T., 2006. Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. *Chemosphere* 63, 1477-1484.
- Okamoto, A., Yamamuro, M., Tatarazako, N., 2015. Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology* 35, 824-830.
- Rai, L., 1998. pH-altered interaction of aluminium and fluoride on nutrient uptake, photosynthesis and other variables of *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology* 42, 67-84.
- Shedd, T.R., Widder, M.W., Toussaint, M.W., Sunkel, M.C., Hull, E., 1999. Evaluation of the annual killifish *Nothobranchius guentheri* as a tool for rapid acute toxicity screening. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2258-2261.
- Stanley, R.A., 1974. Toxicity of heavy metals and salts to eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2, 331-341.
- Toussaint, M.W., Shedd, T.R., van der Schalie, W.H., Leather, G.R., 1995. A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 907-915.
- Wah Chu, K., Chow, K.L., 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquatic Toxicology* 61, 53-64.
- Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L., 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 174-185.
- Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y., Lang, Y., 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/hazardous substances and environmental engineering* 43, 278-284.

CAPÍTULO 2

Efeitos isolados e combinados de zinco e alumínio sobre o fotossistema II de uma microalga de água doce obtidos através de fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM)

Single and combined effects of zinc and aluminum on the photosystem II of a freshwater microalga assessed by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry

Capítulo 2. Efeitos isolados e combinados de zinco e alumínio sobre o fotossistema II de uma microalga de água doce obtidos através de fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM)

Resumo

O aumento da concentração de metais em ambientes aquáticos se deve principalmente às ações antropogênicas, causando risco à biota aquática. Apesar de metais coexistirem nos ambientes naturais, os efeitos dessas misturas metálicas muitas vezes não são levados em conta em análises de risco ecológico. Nos estudos de toxicidade, é essencial que se utilize microalgas como organismos-teste, uma vez que fazem parte da base das cadeias tróficas, e efeitos tóxicos sobre estes organismos podem reverberar sobre toda cadeia alimentar. O presente estudo objetivou estudar, pela primeira vez, os efeitos isolados e combinados de Zn e Al sobre o aparato fotossintético da alga verde *Raphidocelis subcapitata*, utilizando fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM). Após 72 h de exposição, os parâmetros fotossintéticos foram afetados nas concentrações de 0,08 a 0,46 μM Zn e 22,24 a 37,06 μM Al. A eficiência do complexo de evolução do oxigênio - CEO (F_0/F_v) foi reduzida em 25% em 0,46 μM Zn e 82% em 37,06 μM Al, concentrações essas correspondentes, respectivamente, a 57% e 78% de inibição de crescimento algal. Desta forma, inferimos que o crescimento algal foi mais sensível para aferir a toxicidade do Zn, enquanto que F_0/F_v foi a variável mais afetada pelo Al. Com relação aos *quenchings* não fotoquímicos, houve dissipação passiva de energia (aumento de $Y(\text{NO})$) em 0,46 μM Zn. Em 37,06 μM Al, observamos tanto dissipação regulada (aumento de NPQ e $Y(\text{NPQ})$), quanto passiva (aumento de q_N e $Y(\text{NO})$). Nas misturas, obtivemos efeitos sinérgicos e antagônicos nas diferentes concentrações e variáveis estudadas, prevalecendo antagonismo nas concentrações mais altas dos metais e, em alguns casos, efeitos sinérgicos nas menores concentrações de Zn e Al. Isso reitera que os efeitos de misturas nem sempre são

aditivos e, portanto, é de extrema importância que se leve em consideração testes de misturas em análises de risco ecológico para microalgas verdes.

Palavras-chave: Chlorophyta, EROs, fotossíntese, metal, mistura, *quenching*.

1. Introdução

Os metais são elementos abundantes na Terra, chegando aos corpos d'água por fenômenos naturais ou por ações antropogênicas. Os metais podem ser classificados como essenciais, quando fazem parte de estruturas ou processos fisiológicos importantes aos seres vivos, ou não essenciais, quando ainda não possuem função conhecida nos organismos (Nagajyoti et al., 2010)

Ações antropogênicas ligadas ao descarte doméstico, agricultura e atividades industriais elevam os níveis de metais no ambiente (Ochieng et al., 2007). O aumento dos metais no ambiente é preocupante já que, além de exercerem seus efeitos de forma isolada sobre os organismos, há a possibilidade de que os metais exerçam efeitos deletérios mais que aditivos (efeitos sinérgicos) à biota aquática, uma vez que os metais coocorrem nos ambientes naturais (e.g. Dalzochio et al., 2017; Machado et al., 2017; Pereira et al., 2018)

Dentre os organismos componentes da biota aquática, as microalgas são organismos-teste recomendados por organizações nacionais e internacionais (ABNT, 2018; OECD, 2011; USEPA, 2012) para testes ecotoxicológicos e análises de risco ecológico. As microalgas fazem parte da base das cadeias tróficas e possuem notável importância ecológica, visto que são responsáveis por cerca de 50% da produção de O₂ global (Chapman, 2010). Efeitos negativos sobre as microalgas podem reverberar por toda a cadeia trófica, já que são produtores primários e provêm energia para maioria dos organismos aquáticos (Klaine et al., 2002). Assim como os demais organismos vivos, as microalgas necessitam de metais essenciais, em baixas concentrações, para seu pleno funcionamento. No entanto, metais essenciais em concentrações acima do necessário podem causar ruptura à homeostase das microalgas verdes, causando efeitos deletérios sobre o crescimento, parâmetros fotossintéticos e estresse oxidativo (Filova et al., 2021; Machado et al., 2015; Reis et al., 2021; Silva et al., 2018).

Zinco (Zn) e alumínio (Al) são exemplos de metais que coocorrem em corpos d'água

brasileiros (Dalzochio et al., 2017; Machado et al., 2017; Pereira et al., 2018). O Zn é um metal essencial para microalgas, sendo cofator de enzimas como anidrase carbônica (essencial na fisiologia dos processos de fotossíntese e respiração) e constituinte estrutural da enzima superóxido dismutase (Cu-Zn SOD), localizada nos cloroplastos e no citosol (Alscher, 2002; López-Millán et al., 2005; Moroney et al., 2001). Porém, quando o Zn está presente acima das concentrações requeridas pelas microalgas, o mesmo exerce efeitos deletérios tais como inibição de crescimento, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), alterações em parâmetros fotossintéticos e até mesmo alterações ultraestruturais (Aruoja et al., 2009; Farias et al., 2017; Filova et al., 2021). O Al é o elemento mais abundante da crosta terrestre, sendo classificado como metal não essencial pois ainda não possui função biológica conhecida (Exley & Mold, 2015). O Al pode exercer toxicidade sobre microalgas, afetando a eficiência fotossintética, peroxidação lipídica, aumento da produção de EROs e alterações ultraestruturais (Hamed et al., 2019; Saçan et al., 2007).

Mesmo Zn e Al coocorrendo nos ecossistemas aquáticos, poucos estudos relatam a toxicidade combinada desses metais sobre organismos aquáticos. Estudos recentes demonstram que misturas metálicas de Zn e Al causaram efeitos sinérgicos (em baixas concentrações) e antagônicos (em altas concentrações) para a clorofícea *Raphidocelis subcapitata* (Gebara et al., 2020), e efeitos sinérgicos para o cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii* (Gebara et al., 2021). Dessa forma, novos estudos acerca da toxicidade de misturas de Zn-Al devem ser encorajados, tanto com intuito de avaliar outras variáveis, quanto de testar novos organismos-teste.

Apesar de haver um estudo acerca de misturas de Zn-Al sobre crescimento de *R. subcapitata*, é relevante que se testem *endpoints* fisiológicos para que se possa fazer uma análise mais robusta do cenário de toxicidade. Nesse sentido, a citometria de fluxo é uma análise robusta utilizada em ensaios ecotoxicológicos (e.g. Alho et al., 2019; Dos Reis et al., 2022;

Mansano et al., 2017; Moreira et al., 2020), haja visto que por meio dela é possível obter de maneira precisa diversos multiparâmetros em nível populacional (densidade celular) e celular (morfologia, complexidade celular, produção de espécies reativas de oxigênio - EROs). A análise de produção de EROs é de notável importância, visto que a sua produção em excesso pode causar efeitos negativos como peroxidação lipídica e danos ao material genético (Rai et al., 2016). A produção de EROs é associada à toxicidade exercida pelos metais, sem a certeza de que os efeitos associados ao estresse oxidativo são causa ou consequência da exposição aos metais (Stoiber et al., 2013). Porém, sabe-se que os radicais livres em níveis normais possuem papel fundamental em diversas reações biológicas, já que as EROs são produzidas naturalmente em concentrações baixas nos organismos aeróbios, sendo menos de 10% do oxigênio consumido transformado em radicais livres ($O_2^{\bullet-}$ e HO^{\bullet}) e EROs. ($O_2^{\bullet-}$ e HO^{\bullet} e H_2O_2). De modo a controlar os níveis de EROs, há oxidantes de alto (e.g. enzimas antioxidantes) e baixo pesos moleculares (e.g. vitaminas, carotenoides) (Lushchak, 2014).

Sabe-se, ainda, que alguns íons metálicos como, por exemplo, Cd, Cu, Hg, Pb, Ni e Zn podem substituir o magnésio (Mg^{2+}) na molécula de clorofila, inibindo a fotossíntese (Cabrita et al., 2016; Kupper et al., 2002). Dessa forma, além dos parâmetros tradicionais utilizados nos testes de toxicidade, as observações de parâmetros fotossintéticos em fluorômetro de amplitude modulada (PAM) compõem ótimas análises, com obtenção instantânea dos dados, sendo uma ferramenta sensível para análise de toxicidade de metais sobre o fotossistema II (FSII) de microalgas verdes (Echeveste et al., 2017; Machado et al., 2015; Rocha et al., 2021). Através dos parâmetros de eficiência fotossintética do FSII, por exemplo, pode-se detectar *in vivo* as alterações no processo de fotossíntese em concentrações ambientalmente relevantes (Alho et al., 2019). Por meio das análises de fluorimetria PAM, é possível calcular variáveis como: eficiência do complexo de evolução do oxigênio (CEO, F_0/F_v), responsável pela quebra das moléculas de água (Herlory et al., 2013; Kriedemann et al.,

1985); rendimentos máximo (Φ_M) e operacional (Φ_M') do FSII, indicando efeitos na cadeia transportadora de elétrons no processo de fotossíntese (Rocha et al., 2020); bem como *quenchings* fotoquímicos e não fotoquímicos. O *quenching* trata-se da análise de decaimento da fluorescência, sendo classificados como *quenchings fotoquímicos* (qP) os que se referem à energia luminosa utilizada na etapa fotoquímica da fotossíntese; e *quenchings* não fotoquímicos (qN, NPQ, Y(NO), Y(NPQ)) os referentes à energia que é dissipada e não é utilizada em processos fotoquímicos (Juneau et al., 2002; Klughammer & Schreiber, 2008). Dentre os *quenchings* não fotoquímicos, qN e Y(NO) indicam a energia dissipada de forma passiva, enquanto que NPQ e Y(NPQ) se referem a processos de fotoproteção, nos quais a energia é dissipada na forma de calor de maneira regulada (Klughammer & Schreiber, 2008).

Com base nisso, o presente estudo objetivou estudar os efeitos de Zn e Al, isolados e em misturas, sobre os parâmetros fotossintéticos, produção de EROs e crescimento populacional da clorofícea *Raphidocelis subcapitata*, após exposição de 72 h. Segundo dados de distribuição de sensibilidade de espécies aquáticas para Zn e Al, a microalga *R. subcapitata* foi o organismos-teste mais sensível ao Zn e um dos mais sensíveis ao Al (Gebara et al., 2020), sendo esta microalga um excelente indicador de toxicidade para estes compostos. Após revisão bibliográfica, se verificou que há apenas um estudo acerca de efeitos de misturas de Zn e Al sobre o crescimento de uma microalga (Gebara et al., 2020), sendo este o primeiro estudo em que se analisam os efeitos combinados desses metais sobre o aparato fotossintético de uma microalga, além dos efeitos isolados de Al sobre a fotossíntese de uma microalga verde de água doce. Espera-se que nossos resultados ressaltem a importância de análise de múltiplos parâmetros em estudos de toxicidade de misturas metálicas. Esperamos que nossos dados possam guiar normativas e legislações quanto às concentrações máximas de misturas metálicas a serem permitidas nos corpos d'água, de modo a assegurar a proteção das microalgas verdes, base das cadeias tróficas aquáticas.

2. Material e métodos

2.1. Culturas algais e componentes químicos

A microalga verde *Raphidocelis subcapitata* foi cultivada em meio *half-strength* CHU-10 (Nalewajko & O'Mahony, 1989) em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em fotoperíodo 12/12 h claro: escuro (3900 lux, luz fluorescente), em frascos tipo Erlenmeyer de 2 L contendo 1 L de meio de cultivo.

As soluções-teste de Zn e Al foram preparadas a partir de soluções estoque Titrisol® de ZnCl_2 e AlCl_3 (1000 mg metal L^{-1} , Merck, Alemanha). As soluções-teste foram medidas por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, iCAP 7000 Series, Thermo Scientific), de modo que as concentrações nominais não diferiram mais 20% em relação às concentrações medidas, segundo resultados disponíveis em Gebara et al. (2020). As soluções-estoque foram medidas por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS, PerkinElmer PinAAcle 900 T, USA), sendo a variação das concentrações nominais inferior a 10% em relação às concentrações medidas (Gebara et al., 2021). Portanto, neste estudo utilizamos as concentrações nominais.

2.2. Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade foram realizados em frascos de polycarbonato de 500 mL, contendo 250 ml de meio algal *half-strength* CHU-10 (autoclavado a 121°C e 1 atm, por 20 min). As algas em fase exponencial de crescimento foram inoculadas na concentração de 5×10^4 células mL^{-1} . As concentrações dos compostos isolados para Zn foram: 0,08; 0,15; 0,23 e 0,46 μM Zn (0,005; 0,010; 0,015 e 0,030 mg Zn L^{-1}); e para o Al: 14,82; 22,24; 29,65 and 37,06 μM Al (0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg Al L^{-1}). O grupo controle consistiu de meio de cultivo algal sem adição de metais, com concentração de 0,0008 μM Zn (concentração presente no meio $\text{CHU}_{10/2}$) e 0 μM Al. As concentrações das misturas foram definidas através de design *full* fatorial,

combinando-se todas as concentrações dos metais isolados (Fig. S1).

2.3. Phyto-PAM

A fluorescência da clorofila *a* foi medida diariamente utilizando um fluorômetro de pulso de amplitude modulada, com drive óptico ED-101US/MP (Phytoplankton Fluorometer Analyzer, Phyto-PAM, Heinz Walz GmbH, Alemanha). Primeiramente as amostras algais (3 mL) foram adaptadas ao escuro por 15 min, e após aclimação foi aferido a fluorescência inicial (F_0) utilizando luz modulada de baixa intensidade ($1 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), que tem como intuito evitar a redução das plastoquinonas *a* (Q_A) (Juneau et al., 2002). A fluorescência máxima (F_M) foi aferida utilizando pulsos de luz saturante ($0,2 \text{ s}$, $2000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), reduzindo Q_A . A partir desses par\u00e2metros, para amostras lidas em 0, 24, 48 e 72 h, calculou-se: a fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel ($F_V = F_M - F_0$); a efici\u00eancia m\u00e1xima do FSII ($\phi_M = (F_M - F_0) / F_M$) (Schreiber, 2004); e a efici\u00eancia do complexo de evolu\u00e7\u00e3o do O_2 ($F_0 / F_V = F_0 / (F_M - F_0)$) (Kriedemann et al., 1985). Al\u00e9m disso, em 72 h as amostras algais (3 mL) adaptadas ao escuro tamb\u00e9m foram expostas \u00e0 luz cont\u00ednua act\u00ednica ($128 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), com pulsos saturantes a cada 20s durante 15 min, obtendo valores da fluoresc\u00eancia em estado est\u00e1vel (F_S) e da fluoresc\u00eancia m\u00e1xima das c\u00e9lulas adaptadas \u00e0 luz (F_M'). Desta forma, a efici\u00eancia efetiva (ϕ_M') do FSII foi calculada como $\phi_M' = (F_M' - F_S) / F_M'$ (Baker, 2008; Cosgrove & Borowitzka, 2010; Genty et al., 1989). Al\u00e9m disso, foram calculados *quenchings* fotoqu\u00edmico (qP) e n\u00e3o fotoqu\u00edmicos (qN, NPQ, Y(NPQ) e Y(NO)), de acordo com as equa\u00e7\u00f5es da Tabela 1, a seguir:

Tabela 1. Equações para cálculo dos *quenchings* fotoquímico e não fotoquímicos.

<i>Quenching</i>	Equação	Referências
qP	$(F_M' - F_S) / (F_M' - F_0')$	Juneau et al. (2002)
qN	$1 - (F_M' - F_0') / (F_M - F_0)$	Juneau et al. (2002)
NPQ	$(F_M - F_M') / F_M'$	Bilger & Bjorkman (1990); Maxwell & Johnson (2000)
Y(NPQ)	$(F_S / F_M') - F_S / F_M$	Klughammer & Schreiber (2008)
Y(NO)	F_S / F_M	Klughammer & Schreiber (2008)

2.4. Citometria de fluxo

Foi utilizado um citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, EUA) com laser de argônio, azul (15 mW, excitação 488 nm) para as análises de contagem celular (FL3-H vs SSC-H), fluorescência da Chl *a* (FL3-H) e produção de EROs (FL1-H vs FL3-H). As análises de densidade celular seguiram procedimentos de Sarmiento et al. (2008). Para as análises de EROs, adicionou-se o corante DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, número de CAS 2044-85-1, Sigma Aldrich) numa concentração final de 10 μ M, de acordo com procedimentos de Hong et al. (2009). Para todas as análises, utilizaram-se microesferas fluorescentes de 6 μ m (Fluoresbrite carboxylate microspheres; Polysciences, Warrington, Pennsylvania, EUA) como padrão interno.

A porcentagem de EROs foi calculada de acordo com as equações (1) e (2) (Alho et al., 2019; Hong et al., 2009):

$$\text{FL1-H relativo} = \log(\text{FL1-H das amostras}) / \log(\text{FL1-H das microesferas}) \quad (1)$$

$$\text{EROs relativo (\%)} = (\text{FL1-H dos tratamentos} / \text{FL1-H do controle}) \times 100 \quad (2)$$

A partir da densidade celular, foram calculadas as taxas específicas de crescimento: $\mu = [\ln(df) - \ln(di)] / t$, onde: μ = taxa específica de crescimento (dia^{-1}), df = densidade celular em 72 h, di = densidade celular em 0 h, t = tempo de exposição (dias) (USEPA, 2012).

2.5. Misturas: análise das interações

Nos de toxicidade de misturas, os parâmetros analisados foram: μ , fluorescência de Chl *a*, ϕ_M , F_0/F_V and EROs. Para cada um desses parâmetros, considerando modos de ação independentes, de modo a analisar as possíveis interações antagônicas e sinérgicas, utilizamos as equações (3) e (4) (Gottardi et al., 2017):

$$\text{Efeito previsto} = \frac{[\text{Zn}]}{[\text{C}]} \times \frac{[\text{Al}]}{[\text{C}]} \quad (3)$$

$$\text{Efeito observado} = \frac{[\text{M}]}{[\text{C}]} \quad (4)$$

Onde: [C], [Zn], [Al] e [M], respectivamente, correspondem a: grupo controle, zinco isolado, alumínio isolado e misturas.

A partir dos valores de efeito previsto e efeito observado, para μ , Chl *a* e ϕ_M calculou-se a taxa de sinergismo (taxa= efeito previsto/efeito observado - Gottardi et al. (2017)) para estimar possíveis interações sinérgicas ou antagônicas dos metais. Para as variáveis F_0/F_V e EROs calculou-se o inverso da taxa de sinergismo apresentada anteriormente (taxa = 1/(efeito previsto/efeito observado)), para a normalizar a interpretação dos dados, de modo que para ambas as taxas: valores < 1 representem antagonismo; valores > 1 indicam sinergismo; e valores próximos a 1 indicam aditividade.

2.6. Análise estatística

Primeiramente testou-se a normalidade (Shapiro-Wilk) e variância (teste de Levene) dos dados. Após isso, os dados normais foram analisados com análise de variância (ANOVA), *one-way*, seguido por teste de Dunnett. Dados não-normais foram analisados com teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. Para todas as análises, $\alpha = 0.05$. Os dados sofreram transformação logarítmica para as análises estatísticas. As concentrações de inibição de 50% (CI50) e 10% (CI10) referentes à taxa específica de crescimento foram calculadas por meio de equações logísticas de 3 parâmetros: $Y = \text{max}/1 + (C/\text{CI50})^\beta$ e $Y = (\text{max}/(1 + ((0.1/(1 - 0.1)) \times$

$(C/CI10)^\beta$)), onde Y é a resposta do *endpoint*, max é a resposta máxima do *endpoint*, C é a concentração do químico, e β é o *slope*.

3. Resultados e discussão

Após análise bibliográfica, constatamos que, embora existam estudos acerca da toxicidade de Zn sobre o aparato fotossintético de microalgas, estudos sobre os efeitos de Al sobre microalgas são muito escassos, e avaliação de efeitos combinados de Zn e Al sobre fotossíntese destes metais é inexistente. Os efeitos isolados e combinados dos metais Zn e Al foram aferidos para a microalga cosmopolita *R. subcapitata*, exposta a esses metais por 72 h. Uma variável de extrema importância para análises ecotoxicológicas é a especiação dos metais, uma vez que é fator determinante para biodisponibilidade, toxicidade e tomada dos metais (Bjerregaard & Andersen, 2007). A partir de modelo de equilíbrio químico, sabe-se que Zn e Al possuem especiações distintas quando adicionados no meio *half-strength* CHU-10. Segundo análise em MINEQL⁺, do total adicionado de Zn nas soluções-teste, 98% está disponível como cátion Zn²⁺; enquanto que para o Al, 99% ou mais da concentração adicionada está disponível como α -AlO(OH) (diásporo), e apenas 7.33×10^{-8} μ M disponível como Al³⁺ (Gebara et al., 2020). Dessa forma, acreditamos que a especiação explica parcialmente os efeitos causados por Zn em concentrações molares \cong 100 vezes menores que as concentrações de Al.

3.1. Efeitos isolados

3.1.1. Citometria de fluxo: inibição de crescimento e fluorescência da clorofila *a*

As taxas específicas de crescimento (μ) da microalga *R. subcapitata* exposta aos metais Zn e Al por 72 h, são apresentados na Tabela 2. Ambos os metais inibiram o crescimento de *R. subcapitata* após 72 h, de modo que houve diferença significativa (teste de Dunnett, $p < 0,05$) entre todos os tratamentos de Zn e o grupo controle. Já nos tratamentos de Al, houve

diferença significativa (teste de Dunnett, $p < 0,05$) a partir de 22,24 μM Al. Os valores de CI50-72h foram de 0,42 (0,28-0,56) μM Zn (= 0,027 mg Zn L⁻¹) e 27,22 (26,37-28,08) μM Al (= 0,73 mg Al L⁻¹); enquanto que os valores de CI10-72h foram de 0,05 (0,01-0,09) μM Zn (= 0,003 mg Zn L⁻¹) e de 17,01 (15,64-18,37) μM Al (= 0,46 mg Al L⁻¹). Comparando nossos dados de CI50-72h da exposição ao Zn com dados para a mesma microalga, nosso dado ficou próximo ao valor de CE50-72h = 0,04 mg L⁻¹ (Aruoja et al., 2009) e destoou de valores como CE50-72 h = 0,60 μM (Machado & Soares, 2014) e CE50-96h = 0,006 mg L⁻¹ (Medrano & Rico-Martínez, 2015). Com relação à CE50-72h do Al, o valor do presente estudo foi maior do que valores de CE50-96h = 0,34 mg L⁻¹ e 0,57mg L⁻¹ (Gostomski, 1990; Medrano & Rico-Martínez, 2015). Um teste de exposição de Zn sobre *Chlamydomonas reinhardtii* obteve valores de CI50 = 0,038 mg Zn²⁺ L⁻¹, próximo aos valores deste estudo (Mikulic & Beardall, 2014).

Tabela 2. Taxa específica de crescimento (μ) e fluorescência da clorofila *a* (f-Chl *a*) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta aos metais Zn e Al por 72 h. Os valores estão apresentados como média \pm desvio-padrão, de modo que os asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos e o grupo controle (*One-way* ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$).

Zn (μM)	Al (μM)	μ (dia ⁻¹)	f-Chl <i>a</i> (u.a.) ^a
Controle		0,92 \pm 0,04	0,96 \pm 0,01
0,08	-	0,73 \pm 0,06*	0,82 \pm 0,12
0,15	-	0,64 \pm 0,05*	0,71 \pm 0,02*
0,23	-	0,67 \pm 0,04*	0,86 \pm 0,06
0,46	-	0,40 \pm 0,02*	0,82 \pm 0,02
-	14,82	0,90 \pm 0,00	0,73 \pm 0,02*
-	22,24	0,67 \pm 0,02*	0,94 \pm 0,04
-	29,65	0,36 \pm 0,03*	1,17 \pm 0,05*
-	37,06	0,20 \pm 0,00*	1,21 \pm 0,07*

^a (u.a.) = unidades arbitrárias.

Por meio de análise de citometria de fluxo, obtivemos os valores de fluorescência de clorofila *a* (f-Chl *a*) aferida em nível celular. Na exposição da microalga ao Zn, houve diminuição significativa (teste de Dunnett, $p < 0,05$) de 26% de f-Chl *a* apenas na concentração intermediária de $0,15 \mu\text{M}$ Zn em comparação ao controle; enquanto que em exposição ao Al, inicialmente houve uma diminuição significativa (teste de Dunnett, $p < 0,05$) de 24% de f-Chl *a* em $14,82 \mu\text{M}$ Al, seguida de aumento significativo (teste de Dunnett, $p < 0,05$) nas demais concentrações, atingindo um aumento de 26 % de f-Chl *a* na maior concentração testada de $37,06 \mu\text{M}$ Al em relação ao controle (Tabela 2).

3.1.2. Parâmetros fotossintéticos

O Zinco impactou significativamente (teste de Dunnett, $p < 0,05$) a eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_v) em $0,46 \mu\text{M}$ Zn a partir de 24h de exposição, impacto esse que persistiu em 48h e 72h em $0,46 \mu\text{M}$ Zn (Fig. 1A). O Zn também afetou (teste de Dunnett, $p < 0,05$) F_0/F_v de *R. subcapitata* em concentrações a partir de $0,15 \mu\text{M}$ Zn em 48 h e a partir de $0,08 \mu\text{M}$ Zn em 72 h (Fig. 1A). Em 72 h observamos aumento de $\cong 25\%$ de F_0/F_v na maior concentração de $0,46 \mu\text{M}$ Zn (concentração que causou 57% de inibição de crescimento), ou seja, o parâmetro μ foi mais sensível que F_0/F_v .

Da mesma forma, o Zn também afetou (teste de Dunnett, $p < 0,05$) a eficiência fotossintética máxima (Φ_M) da microalga em 24 e 48 h na mesma tendência descrita anteriormente para o F_0/F_v , de modo a causar efeito a partir de $0,46$ e $0,15 \mu\text{M}$ Zn em 24 e 48h, respectivamente; enquanto que em 72h o Zn causou efeito (teste de Dunn, $p < 0,05$) somente na concentração mais alta de $0,46 \mu\text{M}$ Zn (Fig. 1C), da mesma forma que que o rendimento efetivo (Φ_M') em 72 h (Fig. 2A), que também foi afetado (teste de Dunnett, $p < 0,05$) somente em $0,46 \mu\text{M}$ Zn. Em estudo de Machado et al. (2015) com *R. subcapitata*, os autores observaram

diminuição de Φ_M apenas em concentrações mais altas, de 2,5 μM Zn.

No presente estudo, *R. subcapitata* exposta ao Zn teve diminuição de Φ_M já em 24 h, demonstrando que esse endpoint foi sensível ao Zn e, comparando com a literatura, em estudos com a cianofícea *Microcystis aeruginosa*, observou-se diminuição significativa de Φ_M a partir de 48 h de exposição (Deng et al., 2020). Após 72 h de exposição de *M. aeruginosa* ao Zn, Deng et al. (2020) observaram diminuição de 32,7% de Φ_M a partir de 0,2 mg íons Zn L⁻¹ (concentração que causou inibição de crescimento de 21,4%); enquanto que no presente estudo, em 72 h observamos diminuição de \cong 11% de Φ_M a partir de 0,46 μM Zn (concentração que causou 57% de inibição de crescimento). Dessa forma, podemos observar que diferentes microalgas apresentam diferentes respostas: para a cianofícea *M. aeruginosa*, o Φ_M foi um *endpoint* mais sensível do que o crescimento celular; no presente estudo, o crescimento celular de *R. subcapitata* foi mais sensível do que Φ_M . Estudos com *C. reinhardtii* evidenciaram que, para esta alga verde, os parâmetros fotossintéticos não foram sensíveis, visto que não houve alterações em Φ_M nem em NPQ (Mikulic & Beardall, 2014).

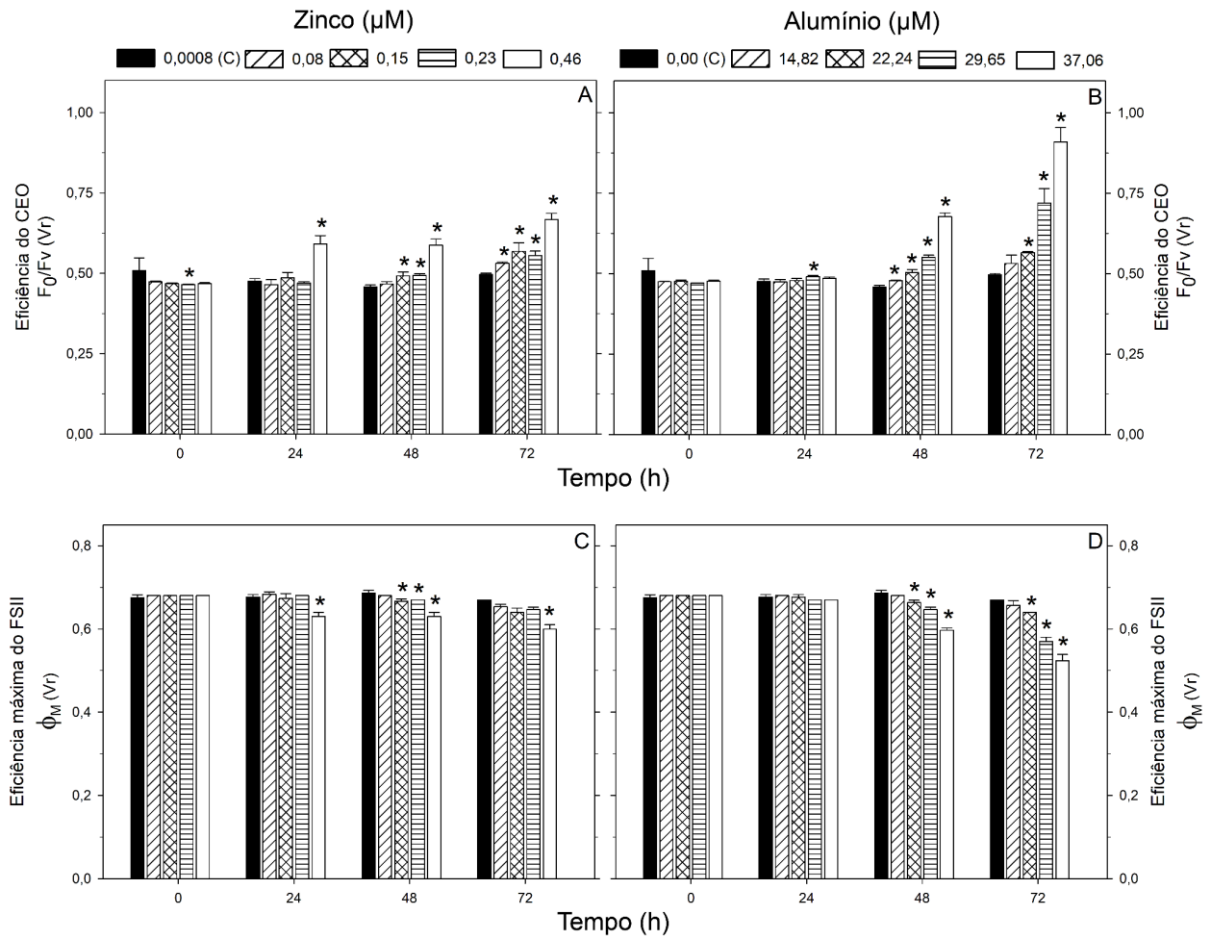


Fig. 1. Parâmetros fotossintéticos, em valores relativos (Vr), da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Zn e Al por 72h. Para a variável eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_v), quanto menor o valor, maior a eficiência (painéis A-B); eficiência máxima (Φ_M) do fotossistema II (FSII), quanto maior o valor, maior a eficiência (painéis C-D). Asteriscos representam diferença significativa para dados normais (*One-way* ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0.05$) e não-normais (Kruskal-Wallis, teste de Dunn, $p < 0,05$). Painéis A (0 h), B (0 h) e C (72 h) são os que contêm dados não-normais.

O Al exerceu efeitos negativos sobre F_0/F_v (teste de Dunnett, $p < 0,05$) de *R. subcapitata* a partir de 29,65; 14,82; e 22,24 μM Al, respectivamente, em 24, 48 e 72 h (Fig. 1B). Em 72 h, na maior concentração testada de 37,06 μM Al destaca-se um aumento de F_0/F_v , ou seja, uma perda eficiência do CEO de cerca de 82% em 72 h (Fig. 1B). Dessa forma, podemos inferir que para *R. subcapitata* exposta ao Al, a variável F_0/F_v foi mais sensível do que μ (inibição de 78% em 37,06 μM Al). Segundo estudo com membranas de tilacóides de espinafre, o Al causa desorganização no cluster $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$, desestabilizando o CEO (Hasni et al., 2013). Os dados de F_0/F_v convergem com os dados de Φ_M , visto que se observou queda do

Φ_M a partir de 22,24 μM Al tanto em 48 quanto em 72 h, concentrações essas em que também houve perda de eficiência do CEO. Em 72 h, evidencia-se a diminuição de 22 % de Φ_M em 37,06 μM Al em relação ao grupo controle (Fig. 1D). Quanto ao Φ_M em 72 h, observou-se queda da eficiência operacional em 29,65 e 37,06 μM Al (Fig. 2B). Por meio desses dados, podemos observar que Al exerce efeito negativo sobre o FSII de *R. subcapitata*, e uma das explicações para estes efeitos é que, segundo estudos, Al pode causar fechamento dos centros de reação do FSII ou danos estruturais sobre o aparato fotossintético de microalgas e plantas, causando danos às membranas dos tilacóides (Chen et al., 2010; Moustakas et al., 1995; Saçan et al., 2007). Estudos com as cianofíceas demonstraram que Al afetou a atividade fotossintética dessas microalgas em até 75,5% para *Anabaena laxa* e 88,7% no caso de *Nostoc muscorum* (Hamed et al., 2019).

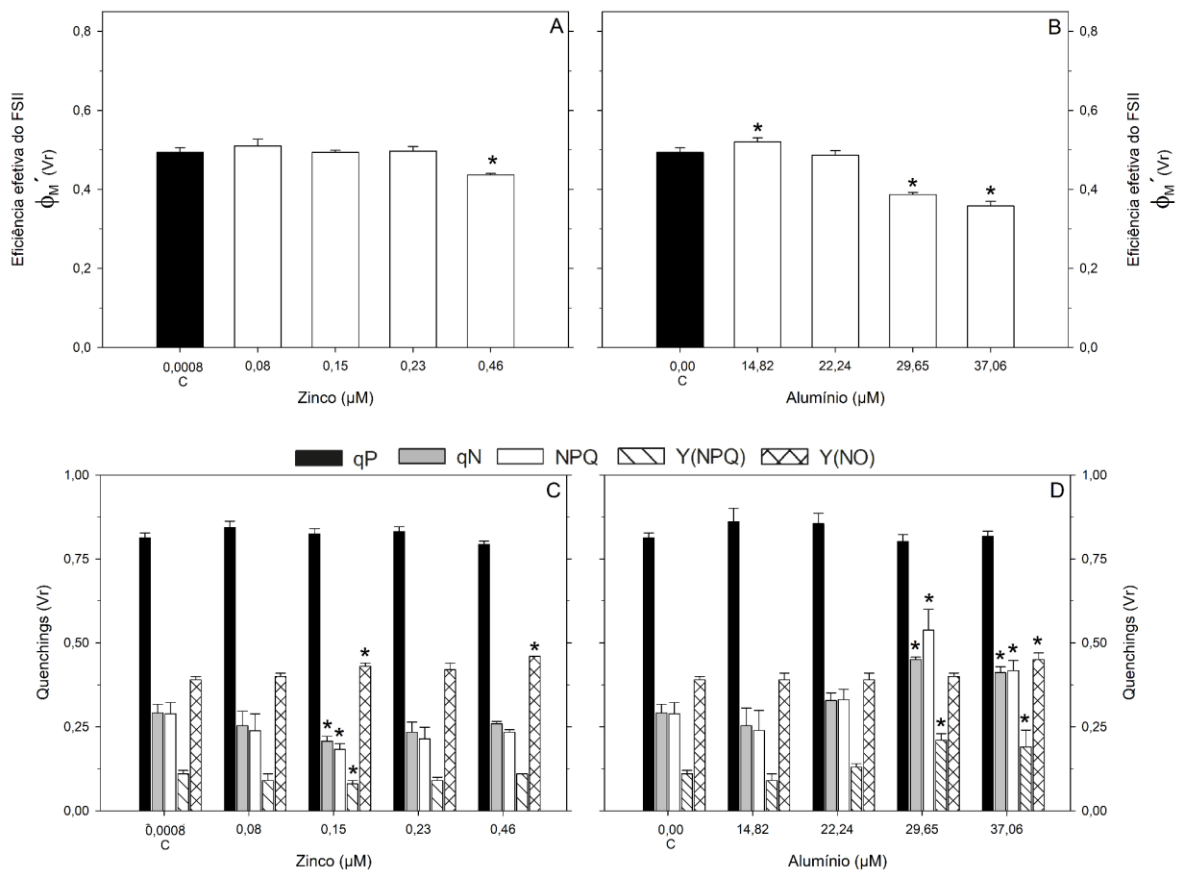


Fig. 2. Parâmetros fotossintéticos, em valores relativos (Vr), da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Zn e Al por 72h. Eficiência efetiva (Φ'_M) do FS II em 72 h (painéis A-B); Quenchings fotoquímico (qP) e não-fotoquímicos (qN, NPQ, Y(NPQ) e Y(NO)) em 72 h (painéis C-D). Asteriscos representam diferença significativa para dados normais (*One-way* ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$).

Quanto aos *quenchings* de *R. subcapitata* em exposição a 0,15 μM Zn (Fig. 2C) observamos aumento de Y(NO) e diminuição de NPQ e Y(NPQ) (teste de Dunnett, $p < 0,05$), ou seja, a microalga diminuiu a perda de energia realizada de maneira regulada (mecanismo de fotoproteção) e aumentou a perda de energia de maneira não regulada. Na maior concentração testada de 0,46 μM Zn, Y(NO) foi a única variável que sofreu aumento significativo (Fig. 2C), indicando aumento da dissipação de energia de forma passiva. Estudos de Mikulic & Beardall (2014) não obtiveram diferenças no NPQ de *C. reinhardtii* em concentrações de até 0,04 mg L^{-1} Zn, o que demonstra que talvez os *quenchings* não sejam variáveis tão sensíveis para aferir toxicidade do Zn sobre microalgas verdes. Em exposição de *R. subcapitata* ao Al, houve aumento significativo (teste de Dunnett, $p < 0,05$) de qN e NPQ e Y(NPQ) em 29,65 μM Al, e aumento de todos os *quenchings* não fotoquímicos em 37,06 μM Al (Fig. 2), indicando aumento de dissipação de energia tanto de maneira passiva quanto regulada. Estudos com plantas expostas ao Al demonstraram diminuição na assimilação de CO_2 , conseqüentemente acumulando maior energia não utilizada na cadeia transportadora de elétrons e, desta forma, as plantas teriam que dissipar esta energia na forma de calor (Chen et al., 2005a; Chen et al., 2005b; Hasni et al., 2013). Isso pode explicar o aumento de *quenchings* não fotoquímicos de *R. subcapitata* exposta ao Al (Fig. 2D), que vão de acordo com dados relatando aumento de NPQ e qN em plantas expostas a este metal (Chen et al., 2010).

3.1.3. Espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção de EROs foi significativamente (teste de Dunnett, $p < 0,05$) alterada nas primeiras 5 h de exposição, havendo uma diminuição de EROs em 0,46 μM Zn (Fig. 3A), e um aumento de EROs em 37,06 μM Al (Fig. 3B). Acreditamos que a diminuição de EROs em 0,46 μM Zn em 5h possivelmente ocorreu devido a ativação precoce de mecanismos antioxidantes da microalga. Ainda em relação ao Zn, houve aumento significativo (teste de Dunnett, $p < 0,05$)

de EROs em relação ao controle em todas as concentrações testadas tanto em 24, 48 e 72 h de exposição. No entanto, de 24 a 72 h observou-se um mesmo padrão, em que houve maior aumento de EROs na menor concentração testada do que na maior concentração, sendo a produção de EROs de $274,47 \pm 16,18\%$ em $0,08 \mu\text{M Zn}$ e $138,58 \pm 15,28\%$ em $0,46 \mu\text{M Zn}$ em 72 h de exposição (Fig. 3A). Em um estudo com um metal de íon bivalente, observou que em exposição de *R. subcapitata* ao cádmio (Cd) uma maior produção de EROs em concentrações menores ($0,02 \mu\text{M Cd}$) do que nas maiores ($0,17 \mu\text{M Cd}$) (Alho et al., 2019). Embora o aumento de EROs possa levar a estresse oxidativo e peroxidação lipídica, um estudo com *R. subcapitata* observou que danos à membrana celular ocorrem apenas na concentração mais elevada testada ($2,5 \mu\text{M Zn}$); segundo os autores, provavelmente a membrana celular não é alvo primário da ação do Zn, uma vez que observaram inibição de crescimento até 50% em tratamentos em que não houve danos às membranas das microalgas (Machado et al., 2015).

Em nosso estudo observamos produção de EROs em baixas concentrações de Zn. Há estudos que também demonstraram presença de estresse oxidativo em microalgas em concentrações baixas. Podemos citar como exemplo um estudo de *M. aeruginosa*, em que houve aumento da enzima superóxido dismutase (SOD) e de malondialdeído (MDA) em concentrações de Zn que não inibiram crescimento, indicando estresse oxidativo e peroxidação lipídica e de proteínas em concentrações baixas de Zn (Deng et al., 2020). Por outro lado, em alguns casos o Zn pode diminuir parcialmente o potencial antioxidante de uma clorofícea, como observado em *Scenedesmus vacuolatus* exposta por 72 h a concentrações de $0,001$ e $0,1 \mu\text{M Zn}^{2+}$, em que se observou diminuição do antioxidante glutatona (GSH) (Le Faucheur et al., 2006).

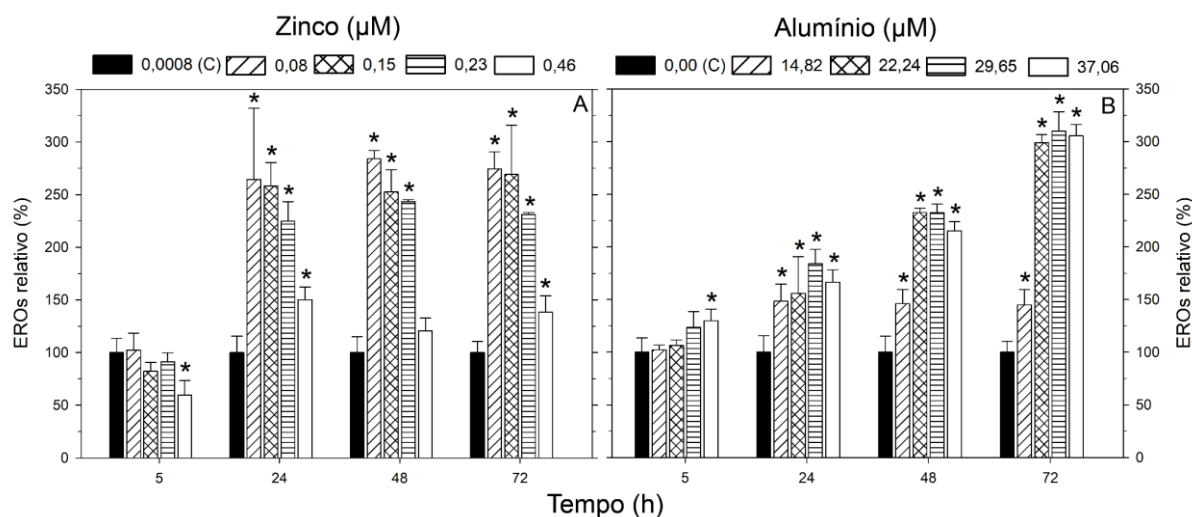


Fig. 3. Valores relativos (%) da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Zn (A) e Al (B) por 72h. Asteriscos representam diferença significativa para dados normais (*One-way* ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,05$).

Em 72 h de exposição ao Zn, o aumento da produção de EROs está inversamente relacionada (Tabela S2-A, $r^2 = 0,82$) ao aumento da inibição do crescimento populacional de *R. subcapitata*, uma vez que houve maior produção de EROs em $0,08 \mu\text{M Zn}$ ($\mu = 0,73 \pm 0,06 \text{ dia}^{-1}$ – Tabela 2) do que em $0,46 \mu\text{M Zn}$ ($0,40 \pm 0,02 \text{ dia}^{-1}$ – Tabela 2). Com relação à exposição de *R. subcapitata* ao Al, também houve aumento significativo (teste de Dunnett, $p < 0,05$) em todas as concentrações testadas em 24, 48 e 72 h, porém com aumento mais proeminente observado nas concentrações mais altas, observando-se $305,37 \pm 10,96\%$ de EROs em $37,06 \mu\text{M Al}$ em 72 h (Fig. 3B). Comparando a produção de EROs da microalga exposta ao Al, a inibição do crescimento populacional segue a mesma tendência de aumento de produção de EROs, quanto maior produção de EROs, maior é a inibição do crescimento (Fig. S2-B, $r^2 = 0,97$). Em microalgas do grupo Cyanophyta, observou-se que Al causou peroxidação lipídica, evidenciada por aumento dos níveis de MDA (Hamed et al., 2019).

3.1.4. Análise dos múltiplos endpoints

A análise de múltiplos endpoints nos ensaios ecotoxicológicos é de importância notória, visto que possibilita uma interpretação mais completa dos efeitos tóxicos dos

contaminantes para os organismos-teste, possibilitando a detecção de efeito tóxico em concentrações subletais no caso das análises fisiológicas (Alho et al., 2019; Reis et al., 2021). De modo a analisar a correlação entre as múltiplas variáveis, gráficos de correlação foram plotados, utilizando-se: inibição do crescimento (IC), produção de EROs, Φ_M e F_0/F_V (Fig. S2).

Analisando o crescimento de *R. subcapitata* exposta aos metais, com relação à exposição ao Zn observa-se que quanto maior a inibição de crescimento (IC), menor foi a produção de EROs (Fig. S2-A, $r^2 = 0,82$) e, portanto, podemos inferir que a produção de EROs não foi uma variável responsável pela maior IC em concentrações mais altas de Zn. Estudos com Zn relatam que o possível mecanismo de toxicidade estaria relacionado com concentrações extra- e não intracelulares do metal, causando alterações na tomada de cálcio, necessário para processo de divisão celular (Arunakumara & Zhang, 2008; Exposito et al., 2017). No que se refere à exposição ao Al observa-se o inverso, de modo que quanto maior a IC, maior produção de EROs (Fig. S2-B, $r^2 = 0,97$). Observando-se os parâmetros fotossintéticos, no que se refere à variável F_0/F_V vs a IC de *R. subcapitata*, podemos inferir que para ambos Zn (Fig. S2-C, $r^2 = 0,86$) e Al (Fig. S2-D, $r^2 = 0,85$), quanto maior o valor de F_0/F_V (ou seja, menor eficiência do CEO), maior a IC. Quando correlacionamos a IC com a Φ_M da microalga, também podemos inferir que quanto menor a Φ_M , maior a IC, tanto para Zn (Fig. S2-E, $r^2 = 0,87$) quanto para Al (Fig. S2-F, $r^2 = 0,93$).

Com relação à produção de EROs, nos tratamentos em exposição ao Zn, os parâmetros F_0/F_V (Fig. S2-G, $r^2 = 0,59$) e Φ_M (Fig. S2-I, $r^2 = 0,59$) não foram afetados pela produção de EROs, de modo que quanto maior eficiência do CEO e do FSII, maior foi a produção de ROS. Um estudo com *R. subcapitata* observou que concentrações a partir de $0,15 \mu\text{M}$ Zn alteraram o potencial de membrana das mitocôndrias, indicando alterações em sua atividade (Machado et al., 2015). Estudos indicam que a mitocôndria possivelmente possui um papel na eficiência fotossintética (Araujo et al., 2014; Nunes-Nesi et al., 2008) e, dessa forma, os danos às

mitocôndrias a partir de 0,15 μM Zn (Machado et al., 2015) pode ter sido um dos alvos de toxicidade do Zn sobre os parâmetros fotossintéticos aferidos no presente estudo, uma vez que nesta concentração observaram-se: alterações em Φ_M e F_0/F_V (Fig. 1A e C) em 48 h; e alterações em f-Chl *a* (Tabela 2) e *quenchings* não-fotoquímicos (q_N , NPQ, Y(NPQ)) - Fig. 2C) em 72 h. Porém, novos estudos precisam ser realizados para elucidar esta questão com mais precisão.

Observamos o oposto na correlação entre produção de EROs e os parâmetros fotossintéticos da microalga em exposição ao Al, de modo que quanto maior a produção de EROs, menor a eficiência do CEO (Fig. S2-G, $r^2 = 0,97$) e do FSII (Fig. S2-J, $r^2 = 0,98$). Portanto, através dos múltiplos *endpoints* inferimos que para Zn: (1) a produção de EROs não afetou o crescimento de *R. subcapitata*, nem sua eficiência do FSII; (2) a inibição do crescimento celular foi correlacionado à queda da eficiência do FSII e do CEO; e para Al: tanto o aumento na produção de EROs, quanto a queda da eficiência do FSII e do CEO foram correlacionados à inibição do crescimento celular.

3.2. Efeitos combinados

Estudos sobre os efeitos de misturas de Zn e Al sobre organismos aquáticos são extremamente escassos na literatura e, portanto, a análise dos efeitos combinados desses metais utilizando diversas variáveis é de extrema relevância. No que se refere à toxicidade combinada de Zn e Al sobre microalgas, até onde sabemos, há apenas um estudo com a microalga *R. subcapitata*, utilizando taxas de crescimento (Gebara et al., 2020). No que se refere a misturas binárias de Zn e Al com outros metais, identificamos na literatura estudos ecotoxicológicos de misturas binárias de Zn com cobre (Cu), cádmio (Cd) e níquel (Ni) (Fettweis et al., 2021; Franklin et al., 2002; Nagai & De Schampelaere, 2016); e efeitos combinados de Al e chumbo (Saçan et al., 2007).

De modo a verificar os efeitos das misturas de Zn e Al sobre as variáveis μ , Chl *a*,

F_0/F_v e EROs de *R. subcapitata* após 72h de exposição, as taxas de sinergismo (estatisticamente significativas) entre valores previstos vs. observados (que indicam possíveis interação antagônicas ou sinérgicas) foram plotadas na Fig. 4. Os dados em detalhes dessas taxas estão disponíveis no Material suplementar (Tabelas S1 a S5).

Em relação à taxa específica de crescimento (μ) de *R. subcapitata* exposta a misturas de Zn e Al por 72 h (Fig. 4A), observamos sinergismo nas menores concentrações dos metais (0,08 μM Zn e 14,82 μM Al) e na maior concentração de Zn vs. a menor de Al (0,46 μM Zn e 14,82 μM Al); enquanto que houve antagonismo nas maiores concentrações de Al e Zn (e.g. 0,46 μM Zn e 37,06 μM Al). Os dados estão de acordo com testes de 96 h com *R. subcapitata*, no qual também houve sinergismo em baixas concentrações e antagonismo e altas concentrações desses metais (Gebara et al., 2020). Estudos de misturas sobre o cladóceros Neotropical *C. silvestrii* também demonstram efeito sinérgico de Zn e Al em concentrações mais baixas (Gebara et al., 2021). Em estudos de misturas binárias Zn com outros metais observaram-se efeitos sinérgicos em misturas de Zn com Ni sobre uma diatomácea, quanto efeitos antagônicos em misturas de Zn com Cu e Cd sobre uma microalga verde (Franklin et al., 2002; Nagai & De Schamphelaere, 2016).

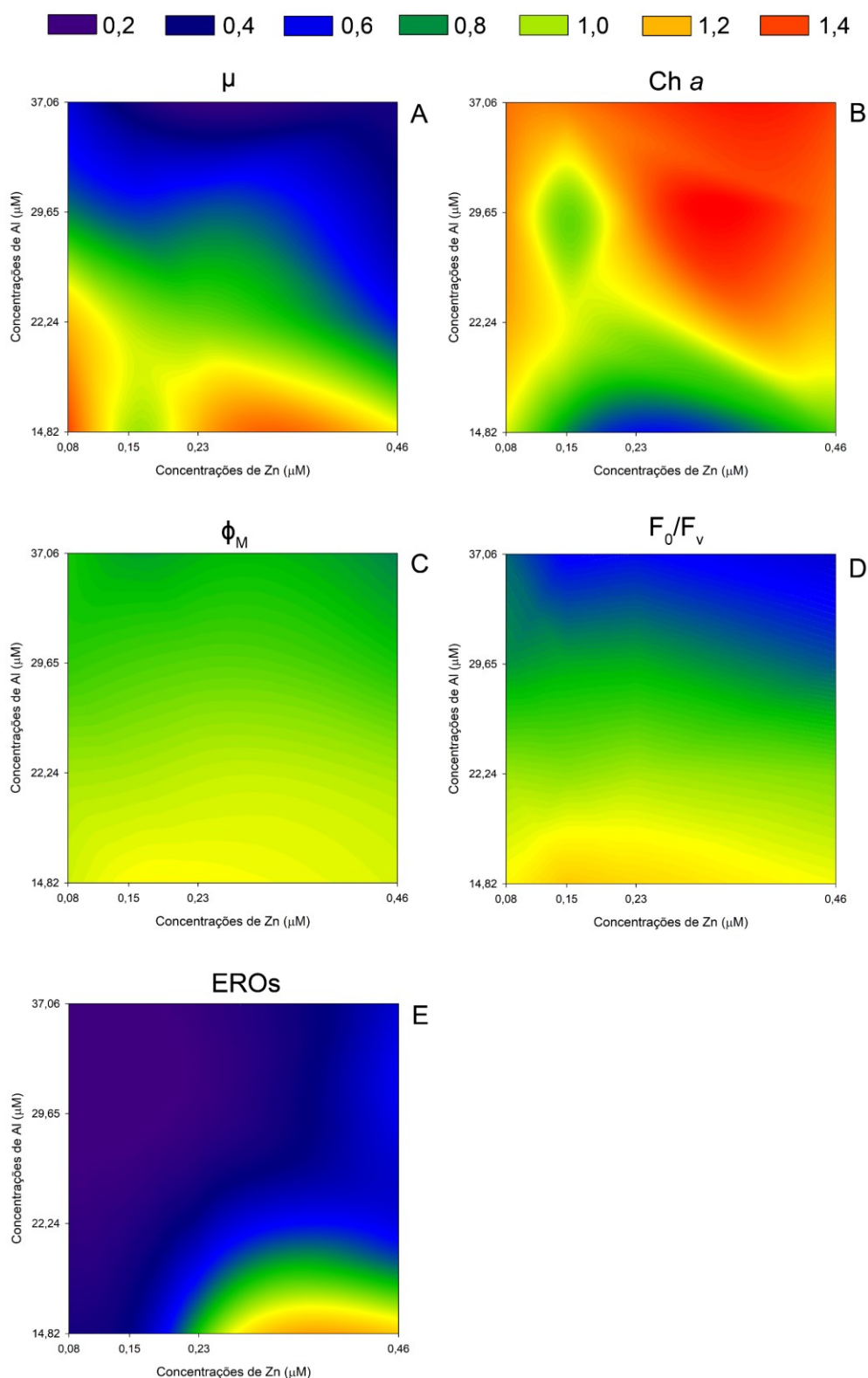


Fig. 4. Efeitos combinados de Zn (μM) e Al (μM) sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta por 72 h. As variáveis apresentadas são taxa específica de crescimento (μ , painel A), fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*, painel B), eficiência máxima do fotossistema II (Φ_M , painel C), eficiência do complexo de evolução do O₂ (F_0/F_v , painel D) e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs, painel E). A legenda de 0,2-1,4 refere à uma taxa entre efeito previsto vs efeito observado nas misturas, onde: valores < 1 indicam antagonismo; valores > 1 indicam sinergismo; e valores próximos a 1 indicam aditividade.

No que se refere aos efeitos combinados de Zn e Al sobre a f-Chl *a* (Fig. 4B), observamos efeitos sinérgicos em todos os tratamentos contendo a menor concentração de Zn (0,08 μM Zn) e efeitos sinérgicos acentuados em algumas das maiores concentrações de Zn e Al (e.g. 0,23 μM Zn vs. 29,65 μM Al e 0,46 μM Zn vs 29,65 μM Al). Apesar dos efeitos sinérgicos acentuados em f-Chl *a*, observamos uma tendência oposta para Φ_M e F_0/F_V . Quanto à variável Φ_M (Fig. 4C), houve sinergismo pouco acentuado nas misturas binárias de Zn vs 14,82 μM Al, nos quais as taxas de valor previsto/observado foram próximas à 1 (Tabela S3), tendendo à aditividade; porém, observamos que as interações passaram a ser antagônicas à medida que aumentou a proporção da dose de Al, havendo antagonismo acentuado em todas as misturas binárias de Zn vs 37,06 μM Al. Em relação a F_0/F_V (Fig. 4D), observamos novamente sinergismo nas misturas binárias de Zn vs 14,82 μM Al e antagonismo em todos os outros tratamentos, com efeitos mais acentuados de antagonismo nas misturas de Zn vs 37,06 μM Al. Segundo Loustau et al. (2019), a alga verde *Uronema confervicolum* exposta a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu apresentou maior valor relativo de Φ_M no tratamento em mistura do que nos tratamentos isolados; porém em concentrações mais elevadas de 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu foi observado sinergismo durante a mistura. Um estudo sobre misturas binárias de cobalto (Co) e Cd sobre *R. subcapitata* obteve dados com mesmas tendências observadas no presente estudo, detectando que Co e Cd afetaram negativamente Φ_M e F_0/F_V nos tratamentos isolados e exerceram efeitos antagônicos destas variáveis durante as misturas dos metais (Dos Reis et al., 2022).

Quanto aos dados de produção de EROs (Fig. 4E), as interações foram no geral antagônicas, com exceção do tratamento 0,46 μM Zn vs. 14,82 μM Al (maior concentração de Zn vs. menor concentração de Al). Em estudos com *Chlorella vulgaris* expostas a misturas binárias de Zn-Hg e Cu-Cd, os metais combinados induziram maior produção de EROs do que os compostos isolados (Ajitha et al., 2021; Qian et al., 2009). Em estudos acerca de misturas de

Al-Pb sobre *Dunaliella tertiolecta*, observou-se efeito sinérgico de estresse oxidativo, no caso danos às membranas celulares (Saçan et al., 2007).

4. Conclusão

Com base em nossos resultados, observamos que tanto Zn quanto Al causaram efeitos tóxicos sobre *R. subcapitata*. No entanto, Zn exerceu toxicidade em concentrações mais baixas do que o Al, tanto para variável crescimento (CI50-72h de 0,42 μM Zn e 27,22 μM Al), quanto para os parâmetros fotossintéticos (diminuição de eficiência do CEO a partir de 0,08 μM Zn e 22,24 μM Al). Comparando a porcentagem de inibição do crescimento com a porcentagem de decaimento da eficiência fotossintética separadamente, podemos observar que: para o Zn, o crescimento (μ) foi o *endpoint* mais sensível; enquanto que o parâmetro fotossintético do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_v) foi o mais afetado negativamente: para Al. Houve aumento de *quenchings* não-fotoquímicos, com dissipação passiva de energia em 0,46 μM Zn – aumento de Y(NO); e dissipação de energia tanto passiva quanto regulada em 37,06 μM Al – aumento de qN, NPQ, Y(NO) e Y(NPQ). Houve aumento de EROs em todas as concentrações, porém para Zn observamos uma tendência inversa, onde aumento de Zn levou a menor EROs; enquanto que para Al, quanto maior a concentração, maior a produção de EROs. Comparando-se as variáveis, o aumento de EROs não foi associado à toxicidade causada pelo Zn sobre os parâmetros de crescimento e fotossintéticos; enquanto que para Al houve associação. Com relação às misturas: para o crescimento, observamos efeitos sinérgicos em baixas concentrações, e efeitos antagônicos em concentrações altas; com relação aos parâmetros F_0/F_v e Φ_M observamos antagonismo em concentrações de 37,06 μM Al. Em geral, quanto às EROs observamos interações antagônicas, com exceção de sinergismo em concentrações altas de Zn e baixas de Al. Dessa forma, concluímos que: (1) em exposição da microalga ao Zn, parâmetros de crescimento foram os mais sensíveis; enquanto que para Al, parâmetros fotossintéticos foram

mais afetados; (2) para Zn e Al, aumento na inibição da taxa de crescimento foi seguida por aumento de EROs, queda de eficiência fotossintética e aumento de dissipação de energia no aparato fotossintético; nas misturas, em geral, evidenciaram-se efeitos antagônicos em altas concentrações e sinérgicos em baixas concentrações. Como, de maneira geral, não foram observados efeitos simplesmente aditivos, recomenda-se o teste de misturas de compostos nas análises de risco ecológico.

Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (processos 2014/14139-3, 2016/00753-7 e 2018/07988-5). MGGM agradece a bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (processo 316064/2021-1). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Declaração de interesse

Nenhuma.

Referências

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2018. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlophyceae). NBR12648. Rio de Janeiro, RJ. 27 pp.
- Ajitha, V., Sreevidya, C.P., Sarasan, M., Park, J.C., Mohandas, A., Singh, I.S.B., Puthumana, J., Lee, J.S., 2021. Effects of zinc and mercury on ROS-mediated oxidative stress-induced physiological impairments and antioxidant responses in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Alho, L.O.G., Gebara, R.C., Paina, K.A., Sarmento, H., Melao, M., 2019. Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. *Ecotoxicol Environ Saf* 169, 950-959.
- Alscher, R.G., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53, 1331-1341.
- Araujo, W.L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., 2014. On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. *Photosynth Res* 119, 141-156.
- Arunakumara, K.K.I.U., Zhang, X., 2008. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of Ocean University of China* 7, 60-64.
- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *The Science of the Total Environment* 407, 1461-1468.
- Baker, N.R., 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59, 89-113.
- Bilger, W., Bjorkman, O., 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* 25, 173-185.
- Bjerregaard, P., Andersen, O.L.E., 2007. Ecotoxicology of Metals—Sources, Transport, and Effects in the Ecosystem, *Handbook on the Toxicology of Metals*, pp. 251-280.
- Cabrita, M.T., Gameiro, C., Utkin, A.B., Duarte, B., Cacador, I., Cartaxana, P., 2016. Photosynthetic pigment laser-induced fluorescence indicators for the detection of changes associated with trace element stress in the diatom model species *Phaeodactylum tricorutum*. *Environ Monit Assess* 188, 285.
- Chapman, R.L., 2010. Algae: the world's most important “plants”—an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 18, 5-12.

Chen, L.-S., Qi, Y.-P., Jiang, H.-X., Yang, L.-T., Yang, G.-H., 2010. Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. *Afr J Biotechnol* 9, 9237-9247.

Chen, L.S., Qi, Y.P., Liu, X.H., 2005a. Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. *Ann Bot* 96, 35-41.

Chen, L.S., Qi, Y.P., Smith, B.R., Liu, X.H., 2005b. Aluminum-induced decrease in CO₂ assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO₂ assimilation. *Tree Physiol* 25, 317-324.

Cosgrove, J., Borowitzka, M.A., 2010. Chlorophyll Fluorescence Terminology: An Introduction, in: Suggett, D., Prášil, O., Borowitzka, M. (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Developments in Applied Phycology.

Dalzochio, T., Ressel Simoes, L.A., Santos de Souza, M., Prado Rodrigues, G.Z., Petry, I.E., Andriguetti, N.B., Herbert Silva, G.J., Gehlen, G., Basso da Silva, L., 2017. Water quality parameters, biomarkers and metal bioaccumulation in native fish captured in the Ilha River, southern Brazil. *Chemosphere* 189, 609-618.

Deng, J., Fu, D., Hu, W., Lu, X., Wu, Y., Bryan, H., 2020. Physiological responses and accumulation ability of *Microcystis aeruginosa* to zinc and cadmium: Implications for bioremediation of heavy metal pollution. *Bioresour Technol* 303, 122963.

Dos Reis, L.L., Alho, L.O.G., de Abreu, C.B., Gebara, R.C., Mansano, A.D.S., Melao, M., 2022. Effects of cadmium and cobalt mixtures on growth and photosynthesis of *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyceae). *Aquat Toxicol* 244, 106077.

Echeveste, P., Silva, J.C., Lombardi, A.T., 2017. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. *Ecotoxicol Environ Saf* 143, 228-235.

Exley, C., Mold, M.J., 2015. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 30, 90-95.

Exposito, N., Kumar, V., Sierra, J., Schuhmacher, M., Gimenez Papiol, G., 2017. Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures. *Sci Total Environ* 601-602, 865-873.

Farias, D.R., Schmidt, E., Simioni, C., Bouzon, Z.L., Hurd, C.L., Eriksen, R.S., Macleod, C.K., 2017. Photosynthetic and ultrastructural responses of *Ulva australis* to Zn stress. *Micron* 103, 45-52.

Fettweis, A., Bergen, B., Hansul, S., De Schampelaere, K., Smolders, E., 2021. Correlated Ni, Cu, and Zn Sensitivities of 8 Freshwater Algal Species and Consequences for Low-Level Metal Mixture Effects. *Environ Toxicol Chem* 40, 2015-2025.

- Filova, A., Fargasova, A., Molnarova, M., 2021. Cu, Ni, and Zn effects on basic physiological and stress parameters of *Raphidocelis subcapitata* algae. *Environ Sci Pollut Res Int* 28, 58426-58441.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., Petocz, P., 2002. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environmental toxicology and chemistry* 21, 2412-2422.
- Gebara, R.C., Alho, L.O.G., Abreu, C.B., Mansano, A.S., Moreira, R.A., Rocha, G.S., Melão, M.G.G., 2021. Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). *Environ Toxicol Chem*.
- Gebara, R.C., Alho, L.O.G., Rocha, G.S., Mansano, A.S., Melão, M.G.G., 2020. Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae *Raphidocelis subcapitata* at environmental concentrations. *Chemosphere* 242, 125231.
- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *BBA-GEN SUBJECTS* 990, 87-92.
- Gostomski, F., 1990. The toxicity of aluminum to aquatic species in the US. *Environ. Geochem. Health* 12, 51-54.
- Gottardi, M., Birch, M.R., Dalhoff, K., Cedergreen, N., 2017. The effects of epoxiconazole and alpha-cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. *Environ Toxicol Chem* 36, 2155-2166.
- Hamed, S.M., Hassan, S.H., Selim, S., Kumar, A., Khalaf, S.M.H., Wadaan, M.A.M., Hozzein, W.N., AbdElgawad, H., 2019. Physiological and biochemical responses to aluminum-induced oxidative stress in two cyanobacterial species. *Environ Pollut* 251, 961-969.
- Hasni, I., Hamdani, S., Carpentier, R., 2013. Destabilization of the oxygen evolving complex of photosystem II by Al^{3+} . *Photochem Photobiol* 89, 1135-1142.
- Herlory, O., Bonzom, J.M., Gilbin, R., 2013. Sensitivity evaluation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to uranium by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Aquat Toxicol* 140-141, 288-294.
- Hong, Y., Hu, H.Y., Xie, X., Sakoda, A., Sagehashi, M., Li, F.M., 2009. Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic toxicology* 91, 262-269.
- Juneau, A., El Berdey, R., Popovic, P., 2002. PAM Fluorometry in the Determination of the Sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas*

reinhardtii to Copper. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 42, 155-164.

Klaine, S.J., Lewis, M.A., Knuteson, S.L., 2002. Phytotoxicity, in: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton Jr, G.A., Cairns Jr, J. (Eds.), Handbook of Ecotoxicology, Second edition ed. CRC press.

Klughammer, C., Schreiber, U., 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. PAM Application Notes 1, 27–35.

Kriedemann, P.E., Graham, R.D., Wiskich, J.T., 1985. Photosynthetic dysfunction and in vivo changes in chlorophyll *a* fluorescence from manganese-deficient wheat leaves. Aust. J. Agric. Res. 36.

Kupper, H., Setlik, I., Spiller, M., Kupper, F.C., Prasil, O., 2002. Heavy Metal-Induced Inhibition of Photosynthesis: Targets of in Vivo Heavy Metal Chlorophyll Formation. Journal of Phycology 38, 429-441.

Le Faucheur, S., Schildknecht, F., Behra, R., Sigg, L., 2006. Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. Aquat Toxicol 80, 355-361.

López-Millán, A.F., Ellis, D.R., Grusak, M.A., 2005. Effect of zinc and manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and raz mutant plants. Plant Sci 168, 1015-1022.

Loustau, E., Ferriol, J., Koteiche, S., Gerlin, L., Leflaive, J., Moulin, F., Girbal-Neuhauser, E., Rols, J.L., 2019. Physiological responses of three mono-species phototrophic biofilms exposed to copper and zinc. Environ Sci Pollut Res Int 26, 35107-35120.

Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem Biol Interact 224, 164-175.

Machado, C.S., Fregonesi, B.M., Alves, R.I.S., Tonani, K.A.A., Sierra, J., Martinis, B.S., Celere, B.S., Mari, M., Schuhmacher, M., Nadal, M., Domingo, J.L., Segura-Munoz, S., 2017. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. Environ Sci Pollut Res 24, 20160-20172.

Machado, M.D., Lopes, A.R., Soares, E.V., 2015. Responses of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to long-term exposure to metal stress. J Hazard Mater 296, 82-92.

Machado, M.D., Soares, E.V., 2014. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. Aquat Toxicol 147, 1-6.

Mansano, A.S., Moreira, R.A., Dornfeld, H.C., Freitas, E.C., Vieira, E.M., Sarmiento, H., Rocha, O., Selegim, M.H.R., 2017. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on

the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 312-321.

Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668.

Medrano, G.E.S., Rico-Martínez, R., 2015. Acute and chronic effects of five metals in a battery of freshwater planktonic organisms. *Fresenius Environmental Bulletin* 24(12b), 4658-4666.

Mikulic, P., Beardall, J., 2014. Contrasting ecotoxicity effects of zinc on growth and photosynthesis in a neutrophilic alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) and an extremophilic alga (*Cyanidium caldarium*). *Chemosphere* 112, 402-411.

Moreira, R.A., Rocha, G.S., da Silva, L.C.M., Goulart, B.V., Montagner, C.C., Melao, M., Espindola, E.L.G., 2020. Exposure to environmental concentrations of fipronil and 2,4-D mixtures causes physiological, morphological and biochemical changes in *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 206, 111180.

Moroney, J.V., Bartlett, S.G., Samuelsson, G., 2001. Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ* 24, 141-153.

Moustakas, M., Ouzounidou, G., Lannoey, R., 1995. Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum-tolerant and non-tolerant wheat cultivar. *J Plant Nutr* 18, 669-683.

Nagai, T., De Schampelaere, K.A., 2016. The effect of binary mixtures of zinc, copper, cadmium, and nickel on the growth of the freshwater diatom *Navicula pelliculosa* and comparison with mixture toxicity model predictions. *Environ Toxicol Chem* 35, 2765-2773.

Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8, 199-216.

Nalewajko, C., O'Mahony, M.A., 1989. Photosynthesis of algal cultures and phytoplankton following an acid pH shock. *Journal of Phycology* 25, 319-325.

Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Gibon, Y., Fernie, A.R., 2008. The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. *J Exp Bot* 59, 1675-1684.

Ochieng, E.Z., Lalah, J.O., Wandiga, S.O., 2007. Analysis of heavy metals in water and surface sediment in five Rift Valley lakes in Kenya for assessment of recent increase in anthropogenic activities. *Bull Environ Contam Toxicol* 79, 570-576.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. 2011. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. 25 pp.

- Pereira, C.A.F., Maia, L.F.O., Faria, M.C.S., Fidencio, P.H., Bomfeti, C.A., Barbosa Junior, F., Rodrigues, J.L., 2018. Seasonal variations, metal distribution and water quality in the Todos os Santos River, Southeastern Brazil: a multivariate analysis. *An Acad Bras* 90, 2701-2710.
- Qian, H., Li, J., Sun, L., Chen, W., Sheng, G.D., Liu, W., Fu, Z., 2009. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquat Toxicol* 94, 56-61.
- Rai, R., Agrawal, M., Agrawal, S.B., 2016. Impact of heavy metals on physiological processes of plants: with special reference to photosynthetic system, in: al., A.S.e. (Ed.), *Plant Responses to Xenobiotics*. Springer Nature Singapore pp. 127-140.
- Reis, L.L.D., Alho, L.O.G., Abreu, C.B., Melao, M., 2021. Using multiple endpoints to assess the toxicity of cadmium and cobalt for chlorophycean *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 208, 111628.
- Rocha, G.S., Parrish, C.C., Espíndola, E.L.G., 2020. Shifts in photosynthetic parameters and lipid production of the freshwater microalga *Selenastrum gracile* (Chlorophyceae) under cadmium exposure. *Journal of Applied Phycology* 32, 4047-4055.
- Rocha, G.S., Parrish, C.C., Espíndola, E.L.G., 2021. Effects of copper on photosynthetic and physiological parameters of a freshwater microalga (Chlorophyceae). *Algal Research* 54.
- Saçan, M.T., Oztay, F., Bolkent, S., 2007. Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to lead and aluminum: toxicity and effects on ultrastructure. *Biol Trace Elem Res* 120, 264-272.
- Sarmiento, H., Unrein, F., Isumbicho, M., Stenuite, S., Gasol, J.M., Descy, J.-P., 2008. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshw. Biol.* 53, 756-771.
- Schreiber, U., 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview, in: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, Dordrecht.
- Silva, J.C., Echeveste, P., Lombardi, A.T., 2018. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 161, 57-63.
- Stoiber, T.L., Shafer, M.M., Armstrong, D.E., 2013. Induction of reactive oxygen species in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to contrasting trace metal exposures. *Environ Toxicol* 28, 516-523.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency. 2012. *Ecological Effects Test Guidelines*. OCSPP 850.4500: Algal Toxicity. 26 pp.

Material suplementar

Fig. S1. Desenho *full* fatorial de testes ecotoxicológicos de *Raphidocelis subcapitata* exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h. A cor dos círculos plotados correspondem a: grupo controle (cinza), tratamento dos metais isolados (branco) e metais em misturas (preto). As concentrações de ambos metais estão representadas em μM .

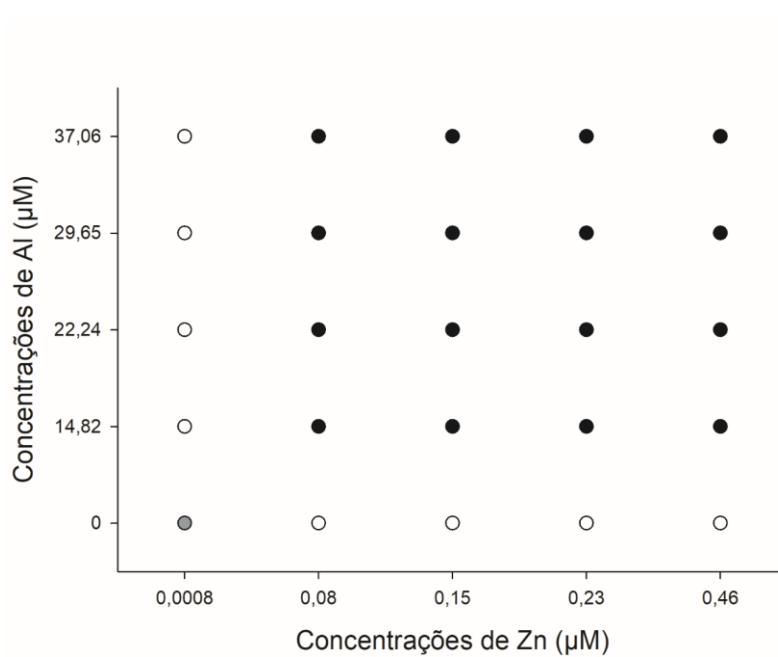


Fig. S2. Relações entre os multiparâmetros da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta por 72 h isoladamente aos metais zinco (painéis à esquerda – A, C, E, G, I) e alumínio (painéis à direita – B, D, F, H, J). Onde: EROs: espécies reativas de oxigênio; F_0/F_V : eficiência do complexo de evolução do O_2 ; Φ_M : eficiência máxima do fotossistema II; Vr: valores relativos.

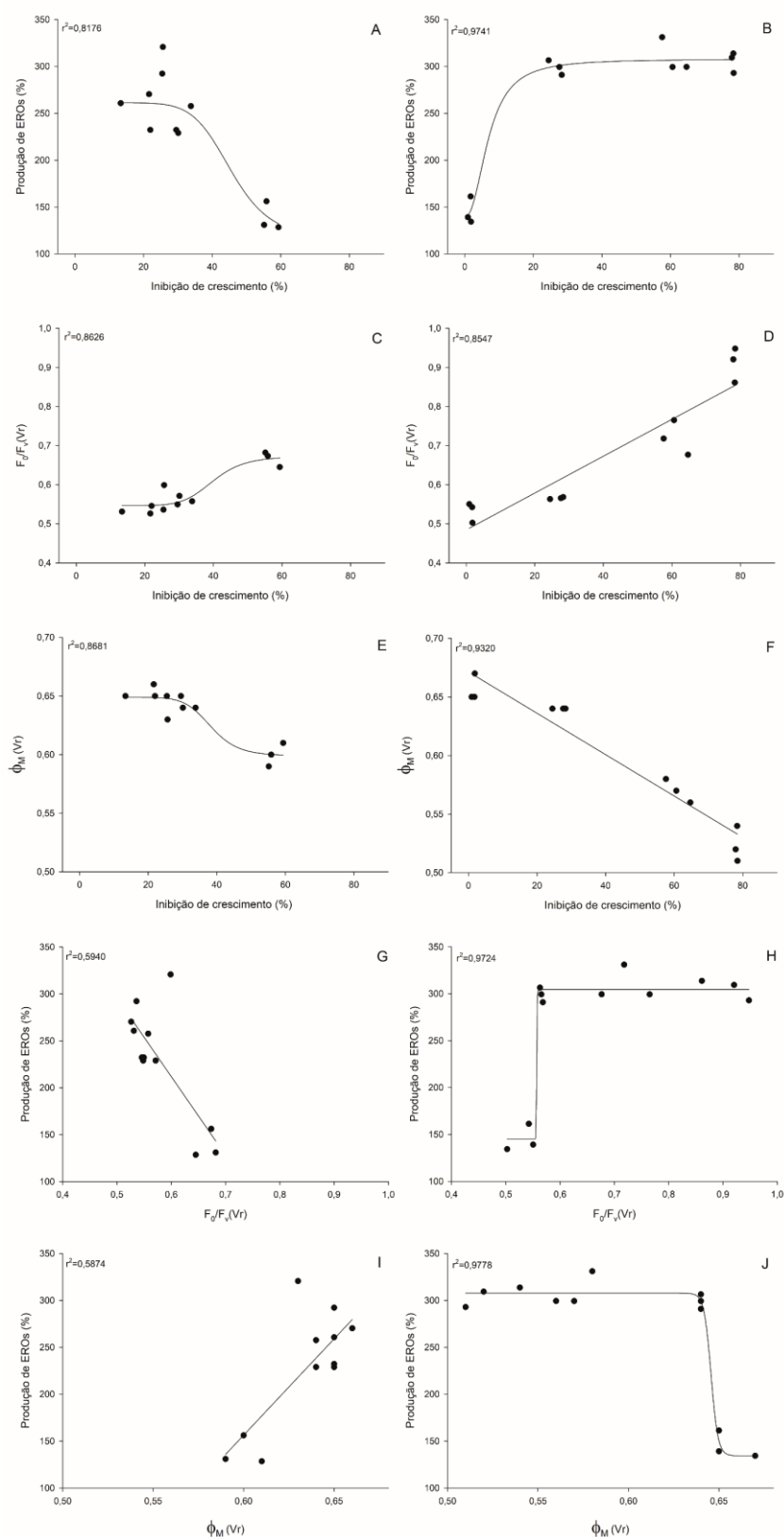


Tabela S1. Taxa específica de crescimento - μ (média \pm desvio padrão) de *Raphidocelis subcapitata* exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72h.

Zn (μ M)	Al (μ M)	μ (dia ⁻¹)				Dados modelados		
		Controle	Zinco	Alumínio	Mistura	Previsto	Observado	Efeito
0,08	14,82	0,92 \pm 0,04	0,73 \pm 0,06	0,90 \pm 0,00	0,51 \pm 0,05	0,78	0,56	S
0,08	22,24	0,92 \pm 0,04	0,73 \pm 0,06	0,67 \pm 0,02	0,45 \pm 0,11	0,58	0,49	S
0,08	29,65	0,92 \pm 0,04	0,73 \pm 0,06	0,36 \pm 0,03	0,37 \pm 0,00	0,31	0,40	A
0,08	37,06	0,92 \pm 0,04	0,73 \pm 0,06	0,20 \pm 0,00	0,28 \pm 0,03	0,17	0,31	A
0,15	14,82	0,92 \pm 0,04	0,64 \pm 0,05	0,90 \pm 0,00	0,63 \pm 0,00	0,69	0,69	-
0,15	22,24	0,92 \pm 0,04	0,64 \pm 0,05	0,67 \pm 0,02	0,46 \pm 0,03	0,51	0,51	-
0,15	29,65	0,92 \pm 0,04	0,64 \pm 0,05	0,36 \pm 0,03	0,36 \pm 0,05	0,27	0,40	A
0,15	37,06	0,92 \pm 0,04	0,64 \pm 0,05	0,20 \pm 0,00	0,39 \pm 0,02	0,15	0,43	A
0,23	14,82	0,92 \pm 0,04	0,67 \pm 0,04	0,90 \pm 0,00	0,55 \pm 0,07	0,72	0,61	S
0,23	22,24	0,92 \pm 0,04	0,67 \pm 0,04	0,67 \pm 0,02	0,52 \pm 0,00	0,54	0,57	A
0,23	29,65	0,92 \pm 0,04	0,67 \pm 0,04	0,36 \pm 0,03	0,36 \pm 0,03	0,29	0,40	A
0,46	14,82	0,92 \pm 0,04	0,40 \pm 0,02	0,90 \pm 0,00	0,36 \pm 0,01	0,43	0,39	S
0,46	22,24	0,92 \pm 0,04	0,40 \pm 0,02	0,67 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02	0,32	0,49	A
0,46	29,65	0,92 \pm 0,04	0,40 \pm 0,02	0,36 \pm 0,03	0,35 \pm 0,05	0,17	0,39	A
0,46	37,06	0,92 \pm 0,04	0,40 \pm 0,02	0,20 \pm 0,00	0,27 \pm 0,04	0,10	0,29	A

Os resultados acima apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$, *one-way* ANOVA, teste de Tukey) entre o grupo controle e os tratamentos ou entre os tratamentos isolados e as misturas. Efeitos observados maiores que os efeitos previstos indica antagonismo (A); enquanto que efeitos observados menores que efeitos previstos indica sinergismo (S).

Tabela S2. Fluorescência da clorofila *a* - Chl *a* (média \pm desvio padrão) de *Raphidocelis subcapitata* exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h.

Zn (μ M)	Al (μ M)	Chl <i>a</i> (u.a.)				Dados modelados		
		Controle	Zinco	Alumínio	Mistura	Previsto	Observado	Efeito
0,08	14,82	0,96 \pm 0,01	0,82 \pm 0,12	0,73 \pm 0,02	0,60 \pm 0,08	0,65	0,62	S
0,08	22,24	0,96 \pm 0,01	0,82 \pm 0,12	0,94 \pm 0,04	0,66 \pm 0,07	0,84	0,69	S
0,08	29,65	0,96 \pm 0,01	0,82 \pm 0,12	1,17 \pm 0,05	0,79 \pm 0,18	1,04	0,83	S
0,15	14,82	0,96 \pm 0,01	0,71 \pm 0,02	0,73 \pm 0,02	0,68 \pm 0,02	0,56	0,71	A
0,15	22,24	0,96 \pm 0,01	0,71 \pm 0,02	0,94 \pm 0,04	0,66 \pm 0,08	0,72	0,68	S
0,15	29,65	0,96 \pm 0,01	0,71 \pm 0,02	1,17 \pm 0,05	0,92 \pm 0,10	0,90	0,96	A
0,15	37,06	0,96 \pm 0,01	0,71 \pm 0,02	1,21 \pm 0,07	0,69 \pm 0,00	0,93	0,72	S
0,23	29,65	0,96 \pm 0,01	0,86 \pm 0,06	1,17 \pm 0,05	0,82 \pm 0,01	1,09	0,85	S
0,46	14,82	0,96 \pm 0,01	0,82 \pm 0,02	0,73 \pm 0,02	0,69 \pm 0,02	0,65	0,72	A
0,46	29,65	0,96 \pm 0,01	0,82 \pm 0,02	1,17 \pm 0,05	0,77 \pm 0,05	1,04	0,80	S

Os resultados acima apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$, *one-way* ANOVA, teste de Tukey) entre o grupo controle e os tratamentos ou entre os tratamentos isolados e as misturas. Efeitos observados maiores que os efeitos previstos indica antagonismo (A); enquanto que efeitos observados menores que efeitos previstos indica sinergismo (S).

Tabela S3. Eficiência quântica máxima do fotossistema II - ϕ_M (média \pm desvio padrão) de *Raphidocelis subcapitata* exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h.

Zn (μ M)	Al (μ M)	ϕ_M (V.r.)				Dados modelados		
		Controle	Zinco	Alumínio	Mistura	Previsto	Observado	Efeito
0,08	14,82	0,67 \pm 0,00	0,65 \pm 0,01	0,66 \pm 0,01	0,62 \pm 0,02	0,96	0,93	S
0,08	22,24	0,67 \pm 0,00	0,65 \pm 0,01	0,64 \pm 0,00	0,63 \pm 0,00	0,93	0,94	A
0,08	29,65	0,67 \pm 0,00	0,65 \pm 0,01	0,57 \pm 0,01	0,62 \pm 0,01	0,83	0,93	A
0,08	37,06	0,67 \pm 0,00	0,65 \pm 0,01	0,52 \pm 0,02	0,58 \pm 0,01	0,75	0,87	A
0,15	14,82	0,67 \pm 0,00	0,64 \pm 0,01	0,66 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	0,94	0,88	S
0,15	22,24	0,67 \pm 0,00	0,64 \pm 0,01	0,64 \pm 0,00	0,61 \pm 0,01	0,91	0,92	A
0,15	37,06	0,67 \pm 0,00	0,64 \pm 0,01	0,52 \pm 0,02	0,61 \pm 0,01	0,74	0,91	A
0,23	14,82	0,67 \pm 0,00	0,65 \pm 0,01	0,66 \pm 0,01	0,60 \pm 0,01	0,96	0,89	S
0,23	22,24	0,67 \pm 0,00	0,65 \pm 0,01	0,64 \pm 0,00	0,61 \pm 0,02	0,93	0,91	S
0,23	29,65	0,67 \pm 0,00	0,65 \pm 0,01	0,57 \pm 0,01	0,60 \pm 0,00	0,83	0,89	A
0,23	37,06	0,67 \pm 0,00	0,65 \pm 0,01	0,52 \pm 0,02	0,60 \pm 0,01	0,75	0,90	A
0,46	14,82	0,67 \pm 0,00	0,60 \pm 0,01	0,66 \pm 0,01	0,57 \pm 0,00	0,88	0,85	S
0,46	22,24	0,67 \pm 0,00	0,60 \pm 0,01	0,64 \pm 0,00	0,58 \pm 0,01	0,86	0,86	A
0,46	29,65	0,67 \pm 0,00	0,60 \pm 0,01	0,57 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	0,76	0,88	A
0,46	37,06	0,67 \pm 0,00	0,60 \pm 0,01	0,52 \pm 0,02	0,60 \pm 0,01	0,70	0,89	A

Os resultados acima apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$, *one-way* ANOVA, teste de Tukey) entre o grupo controle e os tratamentos ou entre os tratamentos isolados e as misturas. Efeitos observados maiores que os efeitos previstos indica antagonismo (A); enquanto que efeitos observados menores que efeitos previstos indica sinergismo (S).

Tabela S4. Eficiência do complexo de evolução do oxigênio - F_0/F_V (média \pm desvio padrão) de *Raphidocelis subcapitata* exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h.

Zn (μ M)	Al (μ M)	F_0/F_V (V.r.)				Dados modelados		
		Controle	Zinco	Alumínio	Mistura	Previsto	Observado	Efeito
0,08	14,82	0,50 \pm 0,00	0,53 \pm 0,00	0,53 \pm 0,03	0,61 \pm 0,04	1,12	1,21	S
0,08	22,24	0,50 \pm 0,00	0,53 \pm 0,00	0,57 \pm 0,00	0,59 \pm 0,01	1,21	1,19	A
0,08	29,65	0,50 \pm 0,00	0,53 \pm 0,00	0,72 \pm 0,04	0,61 \pm 0,02	1,53	1,22	A
0,08	37,06	0,50 \pm 0,00	0,53 \pm 0,00	0,91 \pm 0,04	0,72 \pm 0,03	1,93	1,44	A
0,15	14,82	0,50 \pm 0,00	0,57 \pm 0,03	0,53 \pm 0,03	0,70 \pm 0,02	1,21	1,40	S
0,15	22,24	0,50 \pm 0,00	0,57 \pm 0,03	0,57 \pm 0,00	0,63 \pm 0,01	1,30	1,26	A
0,15	29,65	0,50 \pm 0,00	0,57 \pm 0,03	0,72 \pm 0,04	0,68 \pm 0,01	1,64	1,35	A
0,15	37,06	0,50 \pm 0,00	0,57 \pm 0,03	0,91 \pm 0,04	0,64 \pm 0,02	2,07	1,29	A
0,23	14,82	0,50 \pm 0,00	0,56 \pm 0,01	0,53 \pm 0,03	0,67 \pm 0,01	1,19	1,35	S
0,23	22,24	0,50 \pm 0,00	0,56 \pm 0,01	0,57 \pm 0,00	0,63 \pm 0,06	1,28	1,27	A
0,23	29,65	0,50 \pm 0,00	0,56 \pm 0,01	0,72 \pm 0,04	0,67 \pm 0,01	1,61	1,34	A
0,23	37,06	0,50 \pm 0,00	0,56 \pm 0,01	0,91 \pm 0,04	0,65 \pm 0,02	2,04	1,31	A
0,46	14,82	0,50 \pm 0,00	0,67 \pm 0,02	0,53 \pm 0,03	0,75 \pm 0,01	1,42	1,51	S
0,46	22,24	0,50 \pm 0,00	0,67 \pm 0,02	0,57 \pm 0,00	0,73 \pm 0,02	1,53	1,46	A
0,46	29,65	0,50 \pm 0,00	0,67 \pm 0,02	0,72 \pm 0,04	0,70 \pm 0,03	1,93	1,40	A
0,46	37,06	0,50 \pm 0,00	0,67 \pm 0,02	0,91 \pm 0,04	0,68 \pm 0,02	2,44	1,35	A

Os resultados acima apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$, *one-way* ANOVA, teste de Tukey) entre o grupo controle e os tratamentos ou entre os tratamentos isolados e as misturas. Efeitos observados menores que os efeitos previstos indica antagonismo (A); enquanto que efeitos observados maiores que efeitos previstos indica sinergismo (S).

Tabela S5. Espécies reativas de oxigênio - EROs (média \pm desvio padrão) de *Raphidocelis subcapitata* exposta a misturas de zinco (Zn) e alumínio (Al) por 72 h.

Zn (μ M)	Al (μ M)	ROS (%)				Dados modelados		
		Controle	Zinco	Alumínio	Mistura	Previsto	Observado	Efeito
0,08	14,82	100,00 \pm 10,48	274,47 \pm 16,18	144,96 \pm 14,40	134,09 \pm 23,02	3,98	1,34	A
0,08	29,65	100,00 \pm 10,48	274,47 \pm 16,18	309,99 \pm 18,31	155,29 \pm 3,48	8,51	1,55	A
0,15	14,82	100,00 \pm 10,48	269,10 \pm 46,90	144,96 \pm 14,40	164,78 \pm 48,52	3,90	1,65	A
0,15	29,65	100,00 \pm 10,48	269,10 \pm 46,90	309,99 \pm 18,31	155,24 \pm 12,04	8,34	1,55	A
0,15	37,06	100,00 \pm 10,48	269,10 \pm 46,90	305,37 \pm 10,96	154,53 \pm 34,78	8,22	1,55	A
0,23	14,82	100,00 \pm 10,48	231,17 \pm 1,86	144,96 \pm 14,40	292,73 \pm 40,70	3,35	2,93	A
0,23	29,65	100,00 \pm 10,48	231,17 \pm 1,86	309,99 \pm 18,31	167,49 \pm 3,92	7,17	1,67	A
0,46	14,82	100,00 \pm 10,48	138,58 \pm 15,28	144,96 \pm 14,40	234,08 \pm 28,78	2,01	2,34	S
0,46	22,24	100,00 \pm 10,48	138,58 \pm 15,28	298,93 \pm 7,78	240,99 \pm 8,49	4,14	2,41	A
0,46	29,65	100,00 \pm 10,48	138,58 \pm 15,28	309,99 \pm 18,31	257,79 \pm 23,59	4,30	2,58	A
0,46	37,06	100,00 \pm 10,48	138,58 \pm 15,28	305,37 \pm 10,96	236,25 \pm 18,14	4,23	2,36	A

Os resultados acima apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$, *one-way* ANOVA, teste de Tukey) entre o grupo controle e os tratamentos ou entre os tratamentos isolados e as misturas. Efeitos observados menores que os efeitos previstos indica antagonismo (A); enquanto que efeitos observados maiores que efeitos previstos indica sinergismo (S).

CAPÍTULO 3

Toxicidade e análise de risco de misturas de zinco e alumínio para
Ceriodaphnia silvestrii (Crustacea: Cladocera)

Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia*
silvestrii (Crustacea: Cladocera)

Está é a versão aceita para publicação do seguinte artigo: Gebara, R.C., Alho, L.O.G., Abreu, C.B., Mansano, A.S, Moreira, R.A., Rocha, G.S., Melão, M.G.G. 2021. Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(10), 2912-2922, o qual foi publicado em sua versão final em [<https://doi.org/10.1002/etc.5162>]. Este artigo pode ser utilizado para propósitos não comerciais de acordo com a política de auto arquivamento da Wiley [<http://www.wileyauthors.com/self-archiving>].

This is the accepted version of the following article: Gebara, R.C., Alho, L.O.G., Abreu, C.B., Mansano, A.S, Moreira, R.A., Rocha, G.S., Melão, M.G.G. 2021. Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(10), 2912-2922, which has been published in final form at [<https://doi.org/10.1002/etc.5162>]. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with the Wiley Self-Archiving Policy [<http://www.wileyauthors.com/self-archiving>].

Capítulo 3. Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera)

Abstract

Despite the co-occurrence of metals in aquatic environments, their joint effects are generally not considered during risk assessments. The combined effects of zinc (Zn) and aluminum (Al) on aquatic animals are extremely scarce in the literature, although they are commonly used in domestic and industrial activities. In the present study, we investigated the effects of mixtures of Zn and Al on cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. We evaluated immobility (48h) and ingestion rates (24 h). Moreover, we performed the chronic toxicity tests of single metals. The environmental risks of these substances for tropical freshwaters were estimated from the risk quotient (MEC/PNEC). In immobility tests, results showed 48h EC₅₀ of 0.22 mg Zn L⁻¹ and 0.52 mg Al L⁻¹, and we observed synergistic effects of Zn and Al, following the independent action model. The ingestion rates of *C. silvestrii* were inhibited at 0.1, 0.4, and 0.5 mg Al L⁻¹, and they were increased at 0.08 mg Zn L⁻¹; we observed antagonistic effects in all treatments combined with 0.5 mg Al L⁻¹. Regarding the chronic toxicity, 7-d EC₅₀ occurred at 0.11 mg Zn L⁻¹ and 0.37 mg Al L⁻¹. The risk assessment suggests a potential risk of these metals at environmentally relevant concentrations, especially when in the mixture. Therefore, we recommend mixture toxicity tests during risk assessments to ensure that zooplankton is protected.

Keywords: acute toxicity; combined effect; metal toxicity; reproductive toxicity; risk assessment

Highlights

- In immobility tests, Zn and Al had synergic effects on *C. silvestrii*
- The mixture of Zn and Al is more threatening for zooplankton than Zn and Al isolated
- Zn is more toxic than Al in acute and chronic toxicity tests in single exposures

1. Introduction

Metals occur in water bodies due to natural processes and anthropogenic actions. Although different metals co-occur in most aquatic environments, their recommended concentrations in water bodies are usually based on their single toxicity (e.g., Brazil 2005). Besides the additive responses (sum of individual compound toxicities), the effects of the mixture of metals may cause synergistic (greater than the additive effect) or antagonistic toxicity (smaller than an additive effect) on animals (e.g. Cooper 2009; Son 2016; Gazonato Neto 2019).

Among the metals, zinc (Zn) and aluminum (Al) deserve attention because they have been widely used by human society (Graedel 2005; Liu 2012) and they end up in aquatic ecosystems, where they co-occur (Weber 2013; Dalzochio 2017; Bianchi 2019). In Brazilian freshwaters, Zn concentrations range from 0.002 mg L⁻¹ (Pampulha lake in Friese (2010)) to 1.125 mg L⁻¹ (Piracicaba river in Rodgher (2005)), while Al concentrations range from 0.028 mg L⁻¹ (*Todos os Santos* river in Pereira (2018)) to 3.8 mg L⁻¹ (*Sinos* rive in Steffens (2015)). Despite their co-occurrence, the literature is very scarce about the effects of Zn and Al mixtures on aquatic organisms.

Zinc is an essential metal and is an important component of many enzymes and its trace concentrations are essential for biological processes (Rainbow 2002; Maret 2013). However, despite being an essential metal, a dysfunction in the calcium uptake in the cladocerans' gills seemed to be related to Zn toxicity mechanism (Hyne 2005). In Brazil, 0.18

mg L⁻¹ is the maximum recommended level of Zn for freshwater environments of class 1 (Brazil 2005). On the other hand, Al does not have a known biological function, despite its massive distribution. It is the most abundant metal and is present in cells of all types of organisms (Exley 2015). It is known that Al is neurotoxic to animals (Zatta 2000), for example, modifying the neurotransmitters' levels of the fish *Ctenopharingodon idella* (Fernandez-Davila 2012). Besides that, Al may cause toxicity to aquatic organisms due to respiratory disturbance caused by metal accumulation or due to ionic deregulation of organisms living in acidified waters (Gensemer 2018). Currently, 0.1 mg L⁻¹ is the maximum level of dissolved Al for freshwater class 1 in Brazil (Brazil 2005).

According to SSDs (species sensitivity distributions) of Zn and Al toxicity to aquatic organisms (Gebara 2020), the most and the least sensitive species to Zn are, respectively, the alga *Raphidocelis subcapitata* (96 h IC₅₀: 0.03 mg L⁻¹) and the protozoan *Euplotes patella* (24 h LC₅₀: 50.00 mg L⁻¹). The most sensitive species to Al is the rotifer *Lecane quadridentata* (0.03 mg L⁻¹), and the least sensitive species to Al is the snail *Physa* sp. (41.02 mg L⁻¹). For crustaceans, these metals are toxic at the following levels: *Ceriodaphnia reticulata* (48 h LC₅₀: 0.08 mg Zn L⁻¹), *Daphnia pulex* (48 h LC₅₀: 0.11 mg Zn L⁻¹), *Ceriodaphnia dubia* (48h LC₅₀: 0.13 mg Zn L⁻¹ and 1.9 mg Al L⁻¹), *Daphnia magna* (48h EC₅₀: 0.47 mg Zn L⁻¹ and 0.93 mg Al L⁻¹) and *Hyaella azteca* (7d LC₅₀: 0.056 mg Zn L⁻¹ and 0.089 mg Al L⁻¹) (Mount 1984; Gostomski 1990; Nelson 1998; Borgmann 2005; Okamoto 2015). As far as we know, the combined effects of Zn and Al have never been tested for crustaceans.

The microcrustaceans occupy a central position in the food web, disturbances at this trophic level can perturb the lower and higher trophic levels, representing a threat to aquatic ecosystems. Many studies have focused on addressing the toxicity of metals on primary consumers distributed in temperate regions, such as *D. magna* and *C. dubia*, but it is also very important to understand the toxicity of compounds on tropical species, as risk factors for

tropical species may not be accurate using only species from temperate environments as a parameter. According to Gunnarsson (2018), there is a need to study the effects of substances on tropical native organisms, such as *Ceriodaphnia silvestrii*, a widely distributed species in South America (Fonseca 2004), which is recommended as a test organism by the Brazilian Association of Technical Standards (ABNT 2017). *C. silvestrii* is sensitive to metals (Santos 2008; Sales 2016), pharmaceutical drugs (Damasceno de Oliveira 2018), metallic nanoparticles (Mansano 2018b; Gebara 2019) and pesticides (Mansano 2018a; Silva 2020).

The aim of our study was to evaluate the effects of Zn and Al, isolated and in the mixtures, to the Neotropical cladoceran *C. silvestrii*. For mixture experiments, we evaluated immobility and ingestion rates. For the single compounds, we evaluated the 7-d chronic toxicity test and estimated the intrinsic rates of a population increase in *C. silvestrii*. Preliminary risk-assessments were also estimated, using risk quotients (RQs) to elucidate if mixture treatments would be more harmful to biota than single exposure treatments.

2. Material and methods

2.1. Test organisms and chemicals

Ceriodaphnia silvestrii was cultured in soft artificial water (ASTM 2002) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 12/12h light/dark cycle. The alga *Raphidocelis subcapitata*, which grew in CHU-12 medium (Müller 1972), was used to feed the microcrustaceans at a concentration of 2×10^5 cells mL^{-1} . We also used a compound made of dried yeast and fish ration as a food source (ABNT 2017), prepared according to the procedures described by Gebara (2019).

Titrisol[®] standards (Merck) of ZnCl_2 and AlCl_3 were used as stock solutions. The metal concentration of these standards was confirmed by flame atomic absorption spectrometry (PerkinElmer PinAAcle 900 T, USA), and the results are presented in Table S1 and Figure S1, supporting information. We used MINEQL⁺ software, version 4.6.3.2 (Environmental Research Software, Hallowell, ME, USA) to estimate the free and the complexed amounts of metals in

test solutions and to estimate the ions Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- and SO_4^{2-} in the artificial water (used for the toxicity tests).

2.2. Single toxicity tests

The toxicity tests with *C. silvestrii* followed the Brazilian Association of Technical Standards (ABNT 2016, 2017). For the acute toxicity tests, we tested the concentrations of 0.125; 0.150; 0.200; 0.300; 0.400 mg Zn L⁻¹ and 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.75 mg Al L⁻¹. The control group consisted of only ASTM water. The concentrations were chosen based on preliminary range-finding tests. Each treatment was performed with 4 replicates and 5 neonates (< 24 h-old) per replicate (n = 20) (USEPA 2002a; ABNT 2016). The tests were maintained in incubators at 25 ± 1°C, in the absence of light and without food, as recommended by guidelines (USEPA 2002a; ABNT 2016), and we counted the immobile organisms after 48 h.

For the chronic exposure, besides the control group (only ASTM water), we chose the following sublethal concentrations: 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 0.10 mg Zn L⁻¹ and 0.10; 0.20; 0.30; 0.40; 0.50 mg Al L⁻¹. Each treatment had 10 replicates and 1 neonate (< 24 h-old) per replicate (n = 10) (USEPA 2002b; ABNT 2017). At first, the concentrations were chosen based on the EC10 from the acute toxicity tests and the EC10 was set as the highest concentration. We then adjusted the concentrations based on the mortality and reproduction data obtained in preliminary studies. The tests were maintained under the same experimental conditions described in Section 2.1. The test solutions were replaced every 48 h. The age of the first reproduction, survival percentage and the number of neonates per female were observed under a stereomicroscope daily, and the 7-d EC10 and EC50 were calculated based on the fecundity. The intrinsic rate of population increase (*r*) was calculated using Euler's equation (Abe 2019) - Equation 1:

$$1 = \sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x \quad (1)$$

Where, “*r*” = intrinsic rate of population rate (day⁻¹), “*x*” = age of the organisms

(days), “lx” = probability of survival in the age “x”, and “mx” = number of neonates in the age “x”.

We assessed *C. silvestrii* ingestion rates at the same concentrations of the chronic toxicity test. Each treatment was performed in triplicate, with 5 organisms (48 h-old) per replicate (n = 15). Organisms were placed in flasks containing test solutions with algae and maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h in the dark, as described by Mansano (2018b). An additional replicate was run for each treatment (without animals) to determine the differences from the initial algal concentration. To count the algae, the samples were run in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) according to the methods proposed by Sarmiento (2008), and cell density was obtained using FlowJo software (Treestar.com, version V10.0). Ingestion rates were calculated according to Villarroel (1999) - Equations 2, 3 and 4:

$$F = \frac{V}{n} \times \frac{\ln C_0 - \ln C_t}{t} - A \quad (2)$$

$$A = \frac{\ln C_0 - \ln C_t}{t} \quad (3)$$

$$I = F \times \sqrt{C_0 \times C_t} \quad (4)$$

Where F = filtration rate ($\text{mL ind}^{-1} \text{h}^{-1}$), I = ingestion rate ($\text{cells ind}^{-1} \text{h}^{-1}$), C_0 = algae density (cells mL^{-1}); at 0h, C_t = algae density (cells mL^{-1}) at 24 h, n = the number of organisms per replicate, V = volume of test solution (mL), A = correction factor for changes in algal concentrations at 24 h (C_t) in treatments without animals.

2.3. Mixture toxicity tests

We assessed the mixture effects of Zn and Al using lethal (immobility test) and sublethal (ingestion rates) concentrations, under the same conditions described in Section 2.2. The number of replicates during the immobility toxicity test was diminished from 4 to 3, to allow more treatments per test to obtain a broader range of responses to the chemical mixture

(Pavlaki 2011). For the tests, a full factorial design was chosen, with a control (no metal addition), 10 concentrations of the single compounds and 25 combined concentrations of these metals (Fig. 1).

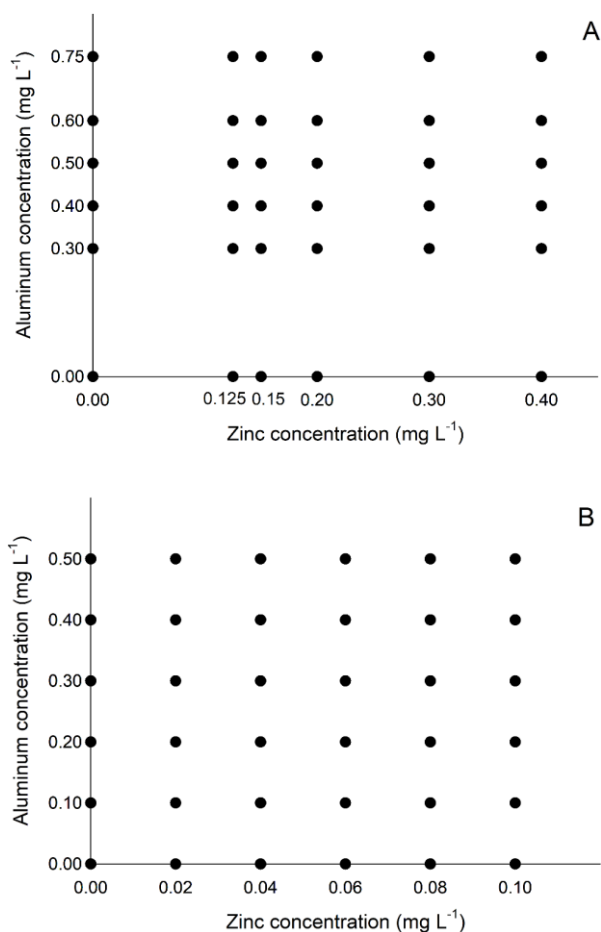


Fig. 1 Full factorial design, representing *Ceriodaphnia silvestrii* in tests with isolated and combined zinc and aluminum, during acute tests (48h) (A) and ingestion rates test (B).

Firstly, we analyzed the data from the acute toxicity tests (immobility as the endpoint) through the concentration addition (CA) and independent action (IA) models using the MIXTOX tool (Jonker 2005). However, acute toxicity data were extended only to IA because they did not fit for CA. From the IA model, the following deviations were evaluated: synergistic/antagonistic interactions (S/A), deviation dose ratio-dependent (DR) and dose level-dependent (DL). Further details can be found in Jonker (2005).

For the ingestion rate experiment during the mixture experiments we used the equations 2, 3 and 4 to calculate the rates. We analyzed the mixture treatments that presented statistical differences from the control or from the single metal exposure. We assumed the independent action (IA) model, in which the joint effects of the compounds correspond to the multiplication of their single effects, with respect to the control. The predicted and observed effects were calculated according to Gottardi (2017) - Equations 5 and 6:

$$\text{Predicted effect} = \frac{[\text{Zn}]}{[\text{C}]} \times \frac{[\text{Al}]}{[\text{C}]} \quad (5)$$

$$\text{Observed effect} = \frac{[\text{M}]}{[\text{C}]} \quad (6)$$

Where: [C], [Zn], [Al] and [M] correspond, respectively, to the ingestion rates of *C. silvestrii* of the following treatments: control group, single zinc, single aluminum and mixture exposure.

2.4. Preliminary risk assessment

The risk quotients (RQs) for *C. silvestrii* exposed to Zn and Al were calculated according to Wee (2019) - Equation 7:

$$\text{RQ} = \frac{\text{MEC}}{\text{PNEC}} \quad (7)$$

Where: RQ = risk quotient, MEC = measured environmental concentration of the compound; PNEC = predicted no effect concentration.

The PNEC (predicted no effect concentration) was calculated according to Wee (2019) - Equation 8:

$$\text{PNEC} = \frac{48 \text{ h EC}_{50}}{\text{AF}} \quad (8)$$

PNEC = predicted no effect concentration. The assessment factor (AF) was fixed to 1000 for the acute toxicity test (EU 2011; OECD 2011). For the risk assessment of the mixture, the 48 h EC₅₀, MEC (measured environmental concentrations) and PNEC values were expressed in toxic units (Freitas 2018). Toxic units were equal to 48 h EC₅₀ for each single

metal.

2.5. EC_x calculation and statistical analyses

The EC50 values were calculated by non-linear regression with a sigmoidal three parameter logistic curve: $Y = \max / (1 + (C/EC50)^\beta)$. The EC10 values were calculated by the non-linear regression logistic curve: $Y = (\max / (1 + ((0.1 / (1 - 0.1)) \times (C/EC10)^\beta)))$. For both equations: Y = response of the endpoint, max = the maximum response of this endpoint, C = concentration of the chemical, β = slope. These equations were calculated on Statistica 7.0 software (Statsoft 2004). EC values are reported through the manuscript as value \pm standard error (95% confidence intervals).

We analyzed significant differences between controls and treatments for mobility, age of first reproduction, fecundity, intrinsic rate of population increasing and ingestion rates. For normal distributed data, we ran one-way ANOVA (Dunnett's post-hoc test); while for non-normal, we used Kruskal-Wallis test (Dunn's post-hoc test). The same tests were used to establish the LOEC (lowest observed effect concentration) values.

3. Results and discussion

3.1. Single effects

3.1.1. Mobility acute toxicity tests

The immobility tests were validated as less than 10% of animals were immobile in controls, the pH did not vary more than 1 unit and dissolved O₂ concentration was above 7.47 mg L⁻¹. The pH and water hardness of these tests are available in Table S2, supporting information. According to MINEQL⁺ analyses, \cong 90% of Zn was available as Zn²⁺, \cong 8.0% as ZnSO_{4(aq)} and \cong 1.5% as ZnOH⁺. With respect to Al, \cong 96% was available as Al(OH)₄⁻ and \cong 2.5% as Al(OH)_{3(aq)} (Tables S3 and S4, supporting information). The amount of the ions Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻ and SO₄²⁻ in the artificial water is available in the Table S5, supporting information.

Zinc significantly led to an increase (Dunnett's test, $p < 0.05$) of immobile organisms from 0.20 mg L^{-1} , while Al significantly caused immobility (Dunnett's test, $p < 0.05$) from 0.40 mg L^{-1} (Fig. 2A and 2B). Thus, the LOEC values are 0.20 mg L^{-1} for Zn and 0.40 mg L^{-1} for Al.

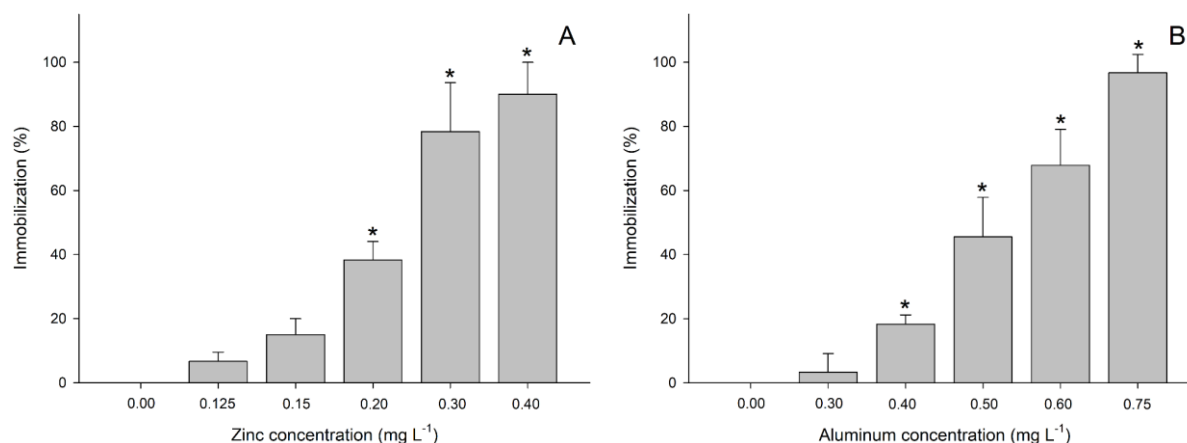


Fig. 2 Immobilization (%) of *Ceriodaphnia silvestrii* in single zinc (A) and aluminum (B) experiments (mg metal L^{-1}), after 48 h. Bars correspond to mean \pm standard deviation. Differences from control (one-way ANOVA, Dunnett's test, $p < 0.05$) are marked with asterisks.

From immobility tests, the mean EC₅₀ was 0.22 ± 0.01 ($0.20 - 0.24$) mg L^{-1} for Zn and 0.52 ± 0.01 ($0.49 - 0.55$) mg L^{-1} for Al, that is, Zn was about 2 times more toxic than Al (Table 1). The mean EC₁₀ occurred at 0.13 ± 0.01 ($0.11 - 0.16$) and 0.36 ± 0.02 ($0.31 - 0.41$) mg L^{-1} for Zn and Al, respectively. The metal speciation analysis (Tables S3 and S4) showed that the majority of Zn was available as Zn^{2+} , while Al^{3+} was not present in test solutions. Thus, we believe that Zn exerted greater acute toxicity to *C. silvestrii* due to the greater bioavailability of Zn as free ion.

Compared to the literature, the EC₅₀ values of the present study for Zn (Table 1) were lower than 0.70 and 0.47 mg L^{-1} for *D. magna* (Meyer 2015; Okamoto 2015). The LC₅₀ values for *Daphnia pulex* and *Ceriodaphnia reticulata* were 0.11 and 0.08 mg L^{-1} , respectively (Mount

1984). The toxic mechanism of Zn is probably related to the disruption of calcium uptake in the gills of fish and cladoceran (Hyne 2005). Moreover, one of the possible causes of the Zn toxicity to cladoceran may be related to hypocalcemia as a correlation was observed between the decrease in the intern calcium concentrations with an increase of the Zn concentrations in *D. magna*, similarly to results observed for fish (Spry 1985; Muysen 2006). Aluminum toxicity mechanism is probably related to ionic or respiratory disturbances, due to metal accumulation (Gensemer 2018). In cladoceran, Al may accumulate on maxillary glands and in ion exchange sites (Gensemer 1999). In acidified waters, Al may also accumulate in fish gills (Poléo 1995), leading to gills' structural damage in *Salvelinus fontinalis*, *Salmo salar*, *Salvelinus alpinus* (Smith 1995; Poléo 2000), although contrasting data describe no damage to the gills of *Carassius carassius* (Poléo 2017).

Table 1. Effective concentration (EC50) values (mg metal L⁻¹) for *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to zinc (Zn) and aluminum (Al) after 48 h. The EC50 values correspond to values ± standard error (95% confidence intervals), calculated from three parameter logistic curves.

48 h EC50		
Exposure	Zn (mg metal L ⁻¹)	Al (mg metal L ⁻¹)
Single	0.22 ± 0.01 (0.20 - 0.24)	0.52 ± 0.01 (0.49 - 0.55)
Mixtures	0.21 ± 0.03 (0.13 - 0.28)	0.54 ± 0.01 (0.52 - 0.56)

Regarding Al, the EC50 values of the present study (Table 1) were lower than 1.9 mg L⁻¹ obtained for *C. dubia* (McCauley 1986; USEPA 2018), and 0.93 mg L⁻¹ for *D. magna* (Okamoto 2015). Aluminum is known to be neurotoxic to animals (Zatta 2000) probably, in part, due to its interaction with neurons, stimulating oxidative damage of the nervous cells (Zatta 2002). Besides that, Al exposure is also correlated to changes in the influx and outflux of sodium and chloride in *D. magna* (Havas 1985).

3.1.2. Chronic toxicity tests and ingestion rates

The mortality was less than 20% in chronic toxicity tests, the pH did not vary more than 1 unit and dissolved O₂ levels were above 7.05 mg L⁻¹. The pH and water hardness of these tests are available in Tables S2 and S6, supporting information. According to MINEQL⁺ analyses of the speciation of the metals on the test solutions, \cong 87% of Zn was available as Zn²⁺, \cong 8.0% as ZnSO_{4(aq)}, \cong 3.0% as ZnOH⁺ and \cong 1.5% as ZnCO_{3(aq)}. Regarding Al, \cong 98% was available as Al(OH)₄⁻ and \cong 1.5% as Al(OH)_{3(aq)} (Tables S3 and S4, supporting information).

Neither metal displayed a statistically significant effect on the age of first reproduction (Fig. 3A and E). Zinc affected the reproduction (Dunnett's test, $p < 0.05$) of *C. silvestrii* from 0.04 mg L⁻¹ (Fig. 3B), with 7-d EC50 and EC10 occurring, respectively, at 0.11 ± 0.03 (0.06 – 0.17) mg L⁻¹ and 0.02 ± 0.01 mg L⁻¹. Naddy (2015) found similar results for *C. dubia*, with EC50 of 0.06 mg L⁻¹, while data from Martins (2017) showed a higher EC50 of 0.65 mg L⁻¹ for *Daphnia longispina*. On the other hand, in our study, Al inhibited (Dunn's test, $p < 0.05$) the production of neonates from 0.4 mg L⁻¹ (Fig. 3F), with EC50 and EC10 of 0.37 ± 0.03 (0.30–0.43) mg L⁻¹ and 0.19 ± 0.05 (0.09–0.28) mg L⁻¹, respectively, that is, Al was about 3.5 times less toxic than Zn to *C. silvestrii*.

All the raw data related to the number of neonates per female is available in Table S7, supporting information.

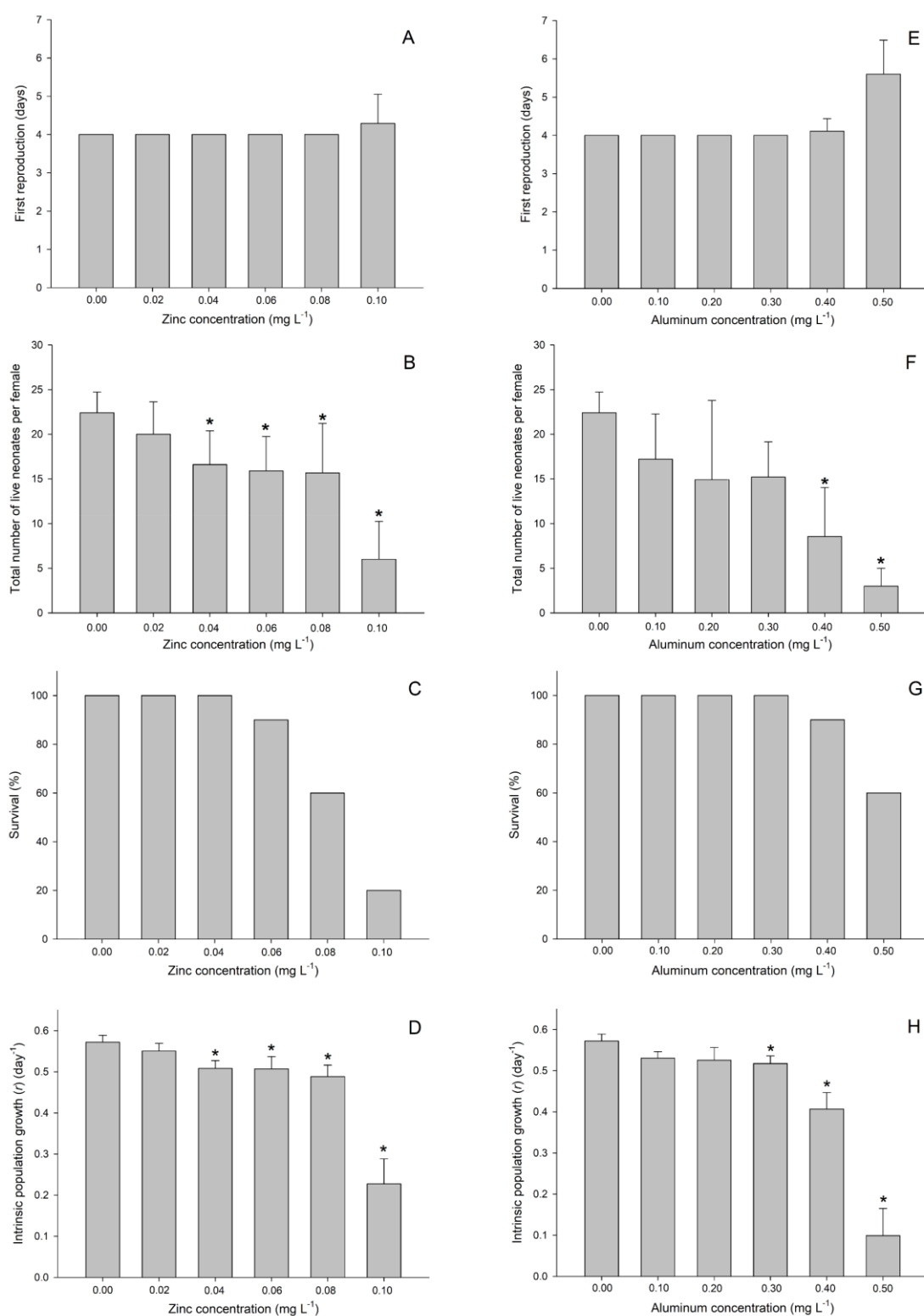


Fig. 3 *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to zinc (A to D) and aluminum (E to H) during 7-d chronic experiments. Columns and bars represent mean values and standard deviation, respectively. Differences from control are marked with asterisks (B= one-way ANOVA, Dunnett's test, $p < 0.05$; A, D, E, F and H = Kruskal-Wallis, Dunn's test, $p < 0.05$).

We believe that presence of Zn^{2+} and the absence of Al^{3+} in test solutions could explain the higher toxicity during Zn exposure. Our toxicity tests were carried out using soft artificial water, with pH around 7 (Tables S2, S6 and S8). It is important to note that physical and chemical parameters of the water may influence the metals toxicity, since they directly interfere in the metals' speciation (Vaananen 2018). Metals are usually bioavailable in their free ions' form. In studies with the cladoceran *Ceriodaphnia dubia* it was observed that Zn toxicity is: pH dependent (the higher the pH, the higher the toxicity for pH between 5.5 and 7.5); hardness dependent (in pH 7.5, Zn was 2.5 times more toxic in water hardness of 44 than in 374 mg $CaCO_3 L^{-1}$); and Zn toxicity was slightly lower at DOC (dissolved organic carbon) concentration up to 10 mg L^{-1} (Hyne 2005). On the other hand, Al seemed to be bioavailable as Al^{3+} in waters with pH 5 or lower, while in neutral solution Al tends to stay as $Al(OH)_3$ precipitate (Rubini 2002). For Al, higher pH, hardness and DOC concentrations leads to lower toxicity to fish and cladoceran (Gensemer 2018).

We observed that *C. silvestrii* exposed to Zn had mortality 3 times higher than the animals exposed to Al, comparing the highest concentrations of both metals (Fig. 3C and 3G). Zn affected the *r* parameter (Fig. 3D) from 0.04 mg L^{-1} (Dunn's test, $p < 0.05$); while Al affected the *r* parameter (Fig. 3H) from 0.30 mg L^{-1} (Dunn's test, $p < 0.05$).

Regarding the ingestion rates at sublethal levels, Zn stimulated an increase (Dunnett's test, $p < 0.05$) in *C. silvestrii* rates at 0.08 mg L^{-1} , although at 0.10 mg L^{-1} there was no statistical difference compared with the control (Fig. 4A). Muysen (2006) also found a trend to increase the ingestion and respiration rates of *D. magna* at 0.08 mg $Zn L^{-1}$ followed by a trend to decrease the rates at higher concentrations, probably due to a Zn hormesis effect. By contrast, under Al exposure *C. silvestrii* had significantly lower ingestion rates (Dunnett's test, $p < 0.05$) at 0.1, 0.4, and 0.5 mg $Al L^{-1}$ (Fig. 4B), compared to the control. At 0.5 mg $Al L^{-1}$, we observed a decrease (Dunnett's test, $p < 0.05$) in the ingestion rates of ≈ 8 times (Fig. 4B).

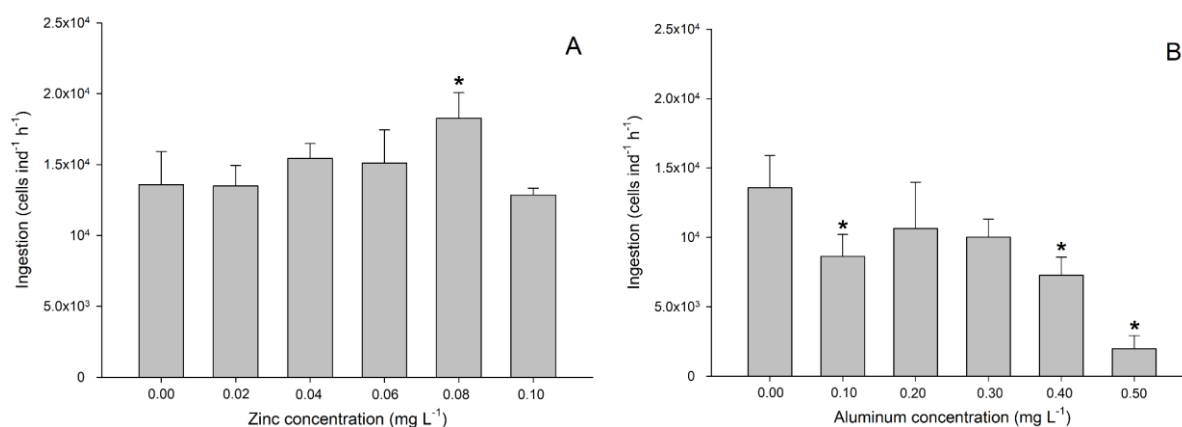


Fig. 4 Ingestion rates (mL ind⁻¹ h⁻¹) of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to zinc (A) and aluminum (B) for 24 h. Differences from the control are marked with asterisks (one-way ANOVA, Dunnett's test, $p < 0.05$).

Analyzing the data from the chronic toxicity tests and the ingestion rates' experiment, we inferred some assumptions as follows, as we believe that the physiological responses may explain some endpoints observed during chronic exposure. First of all, *C. silvestrii* exposed to 0.08 mg L⁻¹ of Zn showed an increase in the ingestion rates (Fig. 4A), although the survival decayed to 60% (Fig. 3C). During Zn exposure, *C. silvestrii* increased the ingestion rates probably as a hormesis effect, consequently maintaining their fecundity rates since the organism had sufficient energy from food resources.

For Al, we suggest that decreased fertility may be correlated with lower ingestion rates, since the lower the ingestion rates, the lower the fecundity. At 0.5 mg Al L⁻¹, the fertility and ingestion rates were, respectively, ≈ 7.5 and 6.8 times lower, compared to the controls, thus we hypothesize that animals with less ingestion of food probably invested less energy in reproduction, in a possible attempt to survive. Comparing *C. silvestrii* in concentrations in which both metals diminished the survival to 60%, that is, 0.08 mg L⁻¹ of Zn (Fig. 3C) and 0.50 mg L⁻¹ of Al (Fig. 3G), we observed that the animals reproduced ≈ 5 times more in Zn-exposure (Fig.3B) than in Al-exposure (Fig. 3F).

3.2. Combined effects

3.2.1. Mobility toxicity test

Water pH and hardness of this test are available in Table S8, supporting information. The modeled data from MIXTOX are available in Table 2. For S/A deviation: negative “a” value indicates synergism; while positive values indicate antagonism. More details of the parameters of Table 2 are available in Table S9, supporting information.

Table 2. Summary of MIXTOX analysis of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed (48 h) to zinc (Zn) and aluminum (Al) mixtures, with fit tests of the independent action model (IA). Bold represents data from the best deviation (lower p value, followed by lower residuals). Data are interpreted according to Jonker (2005). Please see Table S9, supporting information, for more details.

	IA	S/A	DR	DL
Max	0.98	0.98	0.98	0.98
β Zn	1.80	2.96	3.15	2.71
β Al	22.8	23.9	24.7	25.4
EC50 to Zn	0.08	0.23	0.23	0.23
EC50 to Al	0.51	0.53	0.53	0.54
a	-	-10.3	-15.7	20.4
$b_{DR/DL}$	-	-	10.7	9.57
SS	143	31.6	30.7	30.1
r^2	0.65	0.92	0.92	0.92
χ^2 or F test	272	111	0.85	1.50
Df	-	1.00	1.00	1.00
p (χ^2/F)	1.2×10^{-57}	5.5×10^{-26}	0.35	0.22

max = maximum value of the response; β = slope the individual response dose curve; EC50 = median effective concentration; a , b_{DR} and b_{DL} = s function parameters; SS = sum of the squares of the residuals; r^2 = regression coefficient; Test χ^2 or F = statistical test; df = degree of freedom; p (χ^2/F) = level of significance for the statistical test. IA = independent action model, S/A = deviation synergism/antagonism, DR = dose ratio-dependent deviation and DL = dose level dependent deviation.

The data fitted in the IA model produced a sum of the squared residuals (SS) of 143 ($p = 1.2 \times 10^{-57}$, $r^2 = 0.65$). After adding the “a” parameter to describe the S/A deviation, the SS

value decreased to 31.6 ($p = 5.5 \times 10^{-26}$, $r^2 = 0.92$). After adding “a” and “b_{DR}”, DR (SS = 30.7, $p = 0.35$, $r^2 = 0.92$) and DL (SS = 30.1, $p = 0.22$, $r^2 = 0.92$) deviations were not significant. Therefore, S/A deviation from the IA model presented the best fit for the model, indicating synergism (“a” < 0).

Based on the results previously discussed and based on the mixture isobologram (Fig. 5) with concave shapes displayed at the bottom left of the graphic, below the additivity line represented by the thick dashed line. In isobologram, antagonistic effects would be represented by convex shapes displayed above the additivity line. The lines along the shapes represent the response of *C. silvestrii* to the contaminants, being zero the total immobility. Thus, we observed synergic effects for *C. silvestrii*, in tested levels varying from 0.125 to 0.40 mg Zn L⁻¹ and 0.30 to 0.75 mg Al L⁻¹, and the metals Zn and Al had independent modes of action to the microcrustacean, according to the IA model.

Once the legislation that recommends metal concentrations in water bodies is based on single metal toxicity, synergic effects may cause a threat to biota since these interactions are not taken into account. As far as we know, there is only one study about Zn and Al mixtures on an aquatic organism, where the authors observed synergism at lower metal concentrations and antagonism at higher concentrations for the algae *R. subcapitata*, in a range of 0.005 to 0.030 mg Zn L⁻¹ and 0.4 to 1.0 mg Al L⁻¹ (Gebara 2020). It is important to test different compounds for different organisms and at different conditions as these interactions may sometimes be unpredictable. Naddy (2015) suggest that even water hardness may play a role on the compound’s interaction - during *C. dubia* exposure to equitoxic mixtures of cadmium, copper and Zn, they found more than additive effects in hard water and less than additive effects in soft water medium.

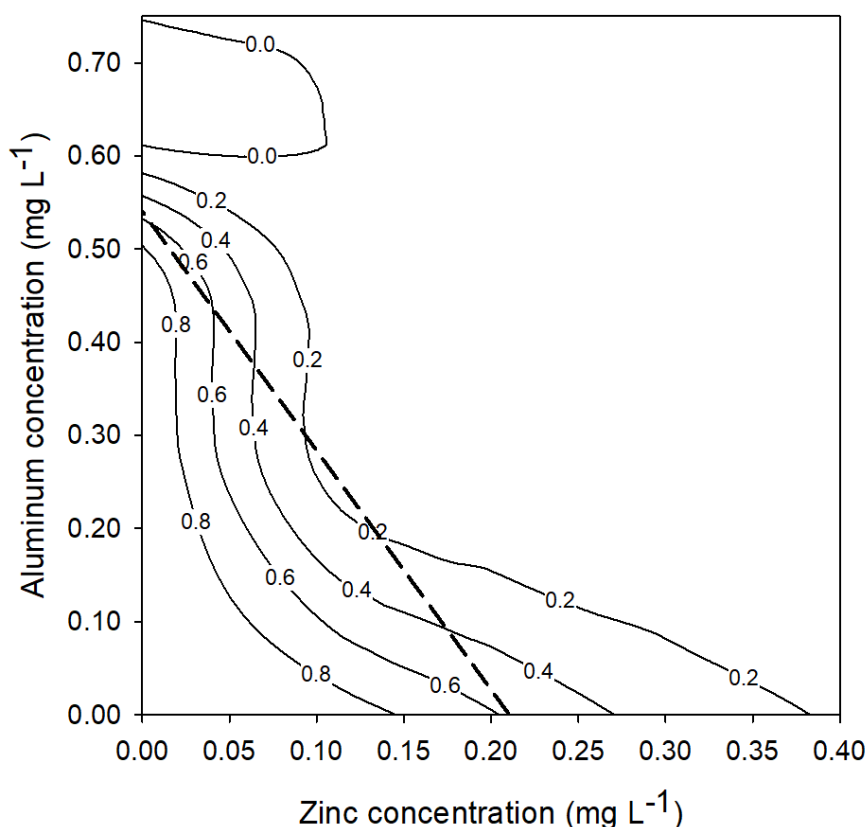


Fig. 5 Mixture experiments of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to zinc and aluminum during 48 h immobility toxicity tests. The isobologram of A represents the independent action model (IA), with synergistic deviation (S/A). The additivity line is represented by the thick dashed line, crossing the EC50 of both metals during single exposure. The concave shapes, below the additivity lines, represent synergism. The numbers along the shapes represent the modelled immobilization ratios of *C. silvestrii* by the deviation models.

3.2.2. Ingestion rates

Inhibition of ingestion rate is a response of toxicity. In the mixture exposure (Table 3), observed ingestion rates lower than predicted ingestion rates are interpreted as synergism, i.e. Zn and Al mixtures inhibited more the ingestion rates than the single exposure to Zn and Al. For other endpoints such as immobility, the interpretation would be the opposite: higher than predicted effects indicate synergism; while lower than predicted effects indicate antagonism. We presented only the statistically significant results in Table 3, the full results (including statistical analyses) are available in Tables S10 and S11, supporting information.

Table 3. Assessment of ingestion rates (mean \pm standard deviation) of *Ceriodaphnia silvestrii* in mixtures of zinc (Zn) and aluminum (Al). Results from mixture treatments presented below were statistically different ($p < 0.05$, One-way ANOVA, Tukey test) from control or from single metals exposure. Observed effects higher than predicted effects indicates antagonism (A), while observed effects lower than the predicted effects indicates synergism (S).

Zn (mg L ⁻¹)	Al (mg L ⁻¹)	Ingestion rate (x 10 ⁴ cells ind ⁻¹ h ⁻¹)				Effect - modeled data		
		Control	Zinc	Aluminum	Mixture	Predicted	Observed	Effect
0.02	0.40	1.36 \pm 0.23	1.35 \pm 0.15	0.73 \pm 0.13	0.91 \pm 0.13	0.53	0.67	A
0.02	0.50	1.36 \pm 0.23	1.35 \pm 0.15	0.20 \pm 0.09	0.64 \pm 0.15	0.15	0.47	A
0.04	0.10	1.36 \pm 0.23	1.54 \pm 0.11	0.86 \pm 0.16	1.10 \pm 0.14	0.72	0.81	A
0.04	0.20	1.36 \pm 0.23	1.54 \pm 0.11	1.06 \pm 0.33	0.87 \pm 0.11	0.89	0.64	S
0.04	0.50	1.36 \pm 0.23	1.54 \pm 0.11	0.20 \pm 0.09	0.58 \pm 0.06	0.17	0.43	A
0.06	0.10	1.36 \pm 0.23	1.51 \pm 0.23	0.86 \pm 0.16	0.77 \pm 0.12	0.71	0.57	S
0.06	0.30	1.36 \pm 0.23	1.51 \pm 0.23	1.00 \pm 0.13	0.72 \pm 0.10	0.82	0.53	S
0.06	0.50	1.36 \pm 0.23	1.51 \pm 0.23	0.20 \pm 0.09	0.78 \pm 0.26	0.16	0.57	A
0.08	0.10	1.36 \pm 0.23	1.83 \pm 0.18	0.86 \pm 0.16	1.76 \pm 0.37	0.86	1.30	A
0.08	0.50	1.36 \pm 0.23	1.83 \pm 0.18	0.20 \pm 0.09	1.31 \pm 0.07	0.20	0.97	A
0.10	0.50	1.36 \pm 0.23	1.29 \pm 0.05	0.20 \pm 0.09	0.89 \pm 0.05	0.14	0.65	A

We observed an antagonistic effect at the lowest Zn concentration (0.02 mg L⁻¹) vs the highest Al concentrations (0.40 and 0.50 mg L⁻¹), as well as at the highest concentrations of Al, for example, 0.04 mg Zn L⁻¹ vs 0.50 mg Al L⁻¹ (Table 3). Moreover, we observed synergism in some low and intermediate concentrations, for example, in the treatments 0.04 mg Zn L⁻¹ vs 0.20 mg Al L⁻¹ (Table 3). We would like to emphasize that although we measured the ingestion rates after 24 h of exposure to the contaminant, we encourage ingestion rate experiments throughout chronic tests to better understand how these physiological responses would affect the fecundity and the body length.

The raw data related to the ingestion rates experiments are available in Table S12, supporting information.

3.3. Preliminary risk assessment

The measured environmental concentrations (MECs) of Zn and Al in natural environments used in the risk assessment calculations were based on a compilation of median measured concentration of Zn and Al obtained from the literature, respectively, for 100 and 36 Brazilian freshwater sites (Tables S13 and S14, supporting information). We calculated RQ's 3 different scenarios: optimistic, realistic and pessimistic using as MEC, respectively, the lowest, the median and the highest environmental concentration.

For the single compounds, the RQs of the realistic scenario were 204 and 1533 for Zn and Al, respectively (Table 4). For Zn, optimistic and pessimist scenarios RQs were about, respectively, 25 times lower and 3 times higher than the realistic scenario. For Al, optimistic and pessimist scenarios RQs were about, respectively, 30 times lower and 2.5 times higher than the realistic scenario. When risk assessment of the realistic scenario was predicted for the mixtures, RQ was 1825 (Table 4), that is, $\cong 9$ times higher than RQ for Zn alone and $\cong 1.2$ times higher than RQ for Al. Comparing to pessimistic and optimistic scenarios, the RQ's were, respectively, 30 times lower and 2.5 times higher than the realistic scenario. Thus, the ecological risk is high in all scenarios, since $RQ \geq 1$ (Wee 2019; Razak 2021); and potential adverse effects may occur since $RQ \geq 100$ (Wentzel 1996; Cristale 2013).

Table 4. Preliminary risk assessment of *Ceriodaphnia silvestrii* in zinc (Zn) and aluminum (Al) experiments, during acute toxicity tests (48 h), where: MEC = measured environmental concentrations (calculated in the present study, based on literature data); PNEC = predict no effect concentration; RQ = risk quotient. The assessment factor is 1000. Optimistic and pessimistic scenarios were calculated, respectively, with the lowest and the highest MECs available in literature (Tables S13 and S14, supporting information). For realistic scenario, MEC were set as the median value of the environmental concentrations (Tables S13 and S14, supporting information).

Scenario	Metals	Exposure	MEC (mg L ⁻¹)	48 h EC50 (mg L ⁻¹)	PNEC (mg L ⁻¹)	RQ
Optimistic	Zn	Single	0.0020	0.23	0.000230	8.70
	Al	Single	0.0279	0.52	0.000520	53.65
	Zn + Al	Mixture	0.0623*	0.95*	0.000952*	65.49
Realistic	Zn	Single	0.05	0.23	0.000230	204
	Al	Single	0.80	0.52	0.000520	1533
	Zn + Al	Mixture	1.74*	0.95*	0.000952*	1825
Pessimistic	Zn	Single	0.1400	0.23	0.000230	608.70
	Al	Single	1.9000	0.52	0.000520	3653.85
	Zn + Al	Mixture	4.2625*	0.95*	0.000952*	4477.46

* Values represented in toxic unit

Since we observed more accentuated effects when metals were combined, we would like to emphasize that including mixture analyses in metal risk assessments would be of great importance in tropical countries, thus obtaining more realistic scenarios. We used the standardized test species *C. silvestrii* in our analyses - a primary consumer, but we also encourage studies to deal with risk assessments of Zn and Al mixtures to other organisms to obtain a more robust risk assessment.

4. Conclusion

Our study showed that the Zn was more toxic than Al during the single exposure tests. In chronic assays, both metals affected the fecundity: Zn inhibited the production of neonates in lower concentrations than Al, although Al inhibits the fecundity more. Regarding ingestion rates, only the Al inhibited *C. silvestrii* rates, which may have affected the fecundity. During the immobility tests with combined metals, Zn and Al had synergic effects to *C. silvestrii*, and the risk assessment pointed out that mixtures would be more threatening than single metals for this organism. In the mixture tests evaluating the ingestion rates, we observed antagonism at the highest Al concentrations. Therefore, we suggest that experiments that address the combined effects of metals should be taken into account in risk analyses as we observed significant interactions between Zn and Al on *C. silvestrii*.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support from the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil – grants #2014/14139-3, 2018/07988-5). M.G.G.M. would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) for the scholarship granted (process number 305229/2016-8). R.A.M. has a postdoctoral fellowship from FAPESP (grant no. 2017/24126-4). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The proofreading of the text was financed by CAPES.

Declarations of interest: none

Data availability statement: Data, associated metadata, and calculation tools are available from the corresponding author (nangebara@gmail.com).

References

- Abe FR, Machado AL, Soares A, Oliveira DP, Pestana JLT. 2019. Life history and behavior effects of synthetic and natural dyes on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 236:124390.
- ABNT - Brazilian National Standards Organization (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 2016. Aquatic ecotoxicology - Acute toxicity - Test with *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). NBR 12713. Rio de Janeiro, RJ, 27 pp.
- ABNT - Brazilian National Standards Organization (Associação Brasileira de Normas Técnicas). 2017. Aquatic ecotoxicology - Chronic toxicity - Test method with *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). NBR 13373. Rio de Janeiro, RJ, 20 pp.
- ASTM - American Society for Testing Materials 2002. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E 729 – 96. United States, 22 pp.
- Bianchi E, Dalzochio T, Simões LAR, Rodrigues GZP, da Silva CEM, Gehlen G, do Nascimento CA, Spilki FR, Ziulkoski AL, da Silva LB. 2019. Water quality monitoring of the Sinos River Basin, Southern Brazil, using physicochemical and microbiological analysis and biomarkers in laboratory-exposed fish. *Ecohydrol Hydrobiol* 19:328-338.
- Borgmann U, Couillard Y, Doyle P, Dixon DG. 2005. Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyaella azteca* at two levels of water hardness. *Environ Toxicol Chem* 24:641-652.
- Brazil - Ministry of the Environment. National Environmental Council - CONAMA. 2005. Resolution n. 357/2005, March 17th. Brasília, DF, 7 pp.
- Cooper NL, Bidwell JR, Kumar A. 2009. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1523-1528.
- Cristale J, Katsoyiannis A, Sweetman AJ, Jones KC, Lacorte S. 2013. Occurrence and risk assessment of organophosphorus and brominated flame retardants in the River Aire (UK). *Environ Pollut* 179:194-200.
- Dalzochio T, Ressel Simoes LA, Santos de Souza M, Prado Rodrigues GZ, Petry IE, Andriguetti NB, Herbert Silva GJ, Gehlen G, Basso da Silva L. 2017. Water quality parameters, biomarkers and metal bioaccumulation in native fish captured in the Ilha River, southern Brazil. *Chemosphere* 189:609-618.
- Damasceno de Oliveira LL, Nunes B, Antunes SC, Campitelli-Ramos R, Rocha O. 2018. Acute and Chronic Effects of Three Pharmaceutical Drugs on the Tropical Freshwater Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Water Air Soil Pollut* 229:1-18.

- EU - European Commission. 2011. Common implementation strategy for the water framework directive (2000/60/EC). In: Guidance Document No: 27: Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards. European Communities. 203 pp.
- Exley C, Mold MJ. 2015. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *J Trace Elem Med Biol* 30:90-95.
- Fernandez-Davila ML, Razo-Estrada AC, Garcia-Medina S, Gomez-Olivan LM, Pinon-Lopez MJ, Ibarra RG, Galar-Martinez M. 2012. Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae-*Ctenopharingodon idella*). *Ecotoxicol Environ Saf* 76:87-92.
- Fonseca AL, Rocha O. 2004. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). *Acta Limnol Bras* 16:319-328.
- Freitas EC, Rocha O, Espindola ELG. 2018. Effects of florfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. *Ecotoxicol Environ Saf* 162:663-672.
- Friese K, Schmidt G, de Lena JC, Arias Nalini H, Zachmann DW. 2010. Anthropogenic influence on the degradation of an urban lake – The Pampulha reservoir in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Limnologica* 40:114-125.
- Gazonato Neto AJ, Moreira RA, Lima J, Daam MA, Rocha O. 2019. Freshwater neotropical oligochaetes as native test species for the toxicity evaluation of cadmium, mercury and their mixtures. *Ecotoxicology* 28:133-142.
- Gebara RC, Alho LOG, Rocha GS, Mansano AS, Melão MGG. 2020. Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae *Raphidocelis subcapitata* at environmental concentrations. *Chemosphere* 242:125231.
- Gebara RC, Souza JP, Mansano AS, Sarmento H, Melao MGG. 2019. Effects of iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄) on life history and metabolism of the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicol Environ Saf* 186:109743.
- Gensemer RW, Gondek JC, Rodriguez PH, Arbildua JJ, Stubblefield WA, Cardwell AS, Santore RC, Ryan AC, Adams WJ, Nordheim E. 2018. Evaluating the effects of pH, hardness, and dissolved organic carbon on the toxicity of aluminum to freshwater aquatic organisms under circumneutral conditions. *Environ Toxicol Chem* 37:49-60.
- Gensemer RW, Playle RC. 1999. The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments. *Crit Rev Env Sci Tec* 29:315-450.
- Gostomski F. 1990. The toxicity of aluminum to aquatic species in the US. *Environ Geochem Health* 12:51-54.

- Gottardi M, Birch MR, Dalhoff K, Cedergreen N. 2017. The effects of epoxiconazole and alpha-cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. *Environ Toxicol Chem* 36:2155-2166.
- Graedel TE, Beers D, Bertram M, Fuse K, Gordon RB, Gritsinin A, Harper EM, Kapur A, Klee RJ, Lifset R, Memon L, Spatari S. 2005. The Multilevel Cycle of Anthropogenic Zinc. *J Ind Ecol* 9:67-90.
- Gunnarsson JS, Castillo LE. 2018. Ecotoxicology in tropical regions. *Environ Sci Pollut Res Int* 25:13203-13206.
- Havas M. 1985. Aluminum Bioaccumulation and Toxicity to *Daphnia magna* in Soft Water at Low pH. *Can J Fish Aquat Sci* 42:1741-1748.
- Hyne RV, Pablo F, Julli M, Markich SJ. 2005. Influence of water chemistry on the acute toxicity of copper and zinc to the cladoceran *Ceriodaphnia cf dubia*. *Environ Toxicol Chem* 24:1667-1675.
- Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJM, Bongers M, Kammenga JE. 2005. Significance Testing of Synergistic/Antagonistic, Dose Level–Dependent, or Dose Ratio–Dependent Effects in Mixture Dose–Response Analysis. *Environ Toxicol Chem* 24:2701-2713.
- Liu G, Müller DB. 2012. Addressing sustainability in the aluminum industry: a critical review of life cycle assessments. *J Clean Prod* 35:108-117.
- Mansano AS, Moreira RA, Dornfeld HC, Diniz LGR, Vieira EM, Daam MA, Rocha O, Selegim MHR. 2018a. Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Environ Sci Pollut Res Int* 25:13335-13346.
- Mansano AS, Souza JP, Cancino-Bernardi J, Venturini FP, Marangoni VS, Zucolotto V. 2018b. Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and *Hypessobrycon eques*. *Environ Pollut* 243:723-733.
- Maret W. 2013. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr* 4:82-91.
- Martins C, Jesus FT, Nogueira AJA. 2017. The effects of Copper and Zinc on survival, growth and reproduction of the cladoceran *Daphnia longispina*: introducing new data in an "old" issue. *Ecotoxicology* 26:1157-1169.
- McCauley DJ, Brooke LT, Call DJ, Lindberg CA. 1986. Acute and chronic toxicity of aluminum to *Ceriodaphnia dubia* at various pH's. *Center for Lake Superior Environmental Stud, Univ Wisconsin-Superior, Superior, WI*.
- Meyer JS, Ranville JF, Pontasch M, Gorsuch JW, Adams WJ. 2015. Acute toxicity of binary and ternary mixtures of Cd, Cu, and Zn to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 34:799-808.

- Mount DI, Norberg TJ. 1984. A seven-day life cycle cladoceran toxicity test. *Environ Toxicol Chem* 3:425-434.
- Müller H. 1972. Wachstum and phosphatbedarf von *Nitzschia actinastroides* (Lemn.) v. Goor in statischer und homokontinuierlicher kultur unter phosphatlimitierung. *Archiv für Hydrobiologie Supplement* 38:399-484.
- Muysen BT, De Schamphelaere KA, Janssen CR. 2006. Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 77:393-401.
- Naddy RB, Cohen AS, Stubblefield WA. 2015. The interactive toxicity of cadmium, copper, and zinc to *Ceriodaphnia dubia* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 34:809-815.
- Nelson SM, Roline RA. 1998. Evaluation of the sensitivity of rapid toxicity tests relative to daphnid acute lethality tests. *Bull Environ Contam Toxicol* 60:292-299.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. 2011. Manual for the assessment of chemicals - Chapter 4: Initial assessment of data. Paris, France, 32 pp.
- Okamoto A, Yamamuro M, Tatarazako N. 2015. Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*. *J Appl Toxicol* 35:824-830.
- Pavlaki MD, Pereira R, Loureiro S, Soares AM. 2011. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:99-110.
- Pereira CAF, Maia LFO, Faria MCS, Fidencio PH, Bomfeti CA, Barbosa Junior F, Rodrigues JL. 2018. Seasonal variations, metal distribution and water quality in the Todos os Santos River, Southeastern Brazil: a multivariate analysis. *An Acad Bras* 90:2701-2710.
- Poléo ABS, Bjerkely F. 2000. Effect of unstable aluminium chemistry on Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Can J Fish Aquat Sci* 57:1423-1433.
- Poléo ABS, Oxnevad SA, Ostbye K, Andersen RA, Oughton DH, Vollestad LA. 1995. Survival of crucian carp, *Carassius carassius*, exposed to a high low-molecular weight inorganic aluminium challenge. *Aquat Sci* 57:350-359.
- Poléo ABS, Schjolden J, Sorensen J, Nilsson GE. 2017. The high tolerance to aluminium in crucian carp (*Carassius carassius*) is associated with its ability to avoid hypoxia. *PLoS One* 12:e0179519.
- Rainbow PS. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ Pollut* 120:497-507.

Razak MR, Aris AZ, Zakaria NAC, Wee SY, Ismail NAH. 2021. Accumulation and risk assessment of heavy metals employing species sensitivity distributions in Linggi River, Negeri Sembilan, Malaysia. *Ecotoxicol Environ Saf* 211:111905.

Rodgher S, Espindola EL, Rocha O, Fracacio R, Pereira RH, Rodrigues MH. 2005. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tiete River (Sao Paulo, Brazil). *Braz J Biol* 65:697-710.

Rubini P, Lakatos A, Champmartin D, Kiss T. 2002. Speciation and structural aspects of interactions of Al(III) with small biomolecules. *Coord Chem Rev* 228:137-152.

Sales SC, Rietzler AC, Ribeiro MM. 2016. Arsenic toxicity to cladocerans isolated and associated with iron: implications for aquatic environments. *An Acad Bras* 88 539-548.

Santos MA, Melao MG, Lombardi AT. 2008. The effects of humic substances on copper toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera). *Ecotoxicology* 17:449-454.

Sarmento H, Unrein F, Isumbisho M, Stenuite S, Gasol JM, Descy J-P. 2008. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshw Biol* 53:756-771.

Silva LCM, Moreira RA, Pinto TJS, Ogura AP, Yoshii MPC, Lopes LFP, Montagner CC, Goulart BV, Daam MA, Espindola ELG. 2020. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology* 29:1462-1475.

Smith TR, Haines TA. 1995. Mortality, growth, swimming activity and gill morphology of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to low pH with and without aluminum. *Environ Pollut* 90:33-40.

Son J, Lee YS, Kim Y, Shin KI, Hyun S, Cho K. 2016. Joint toxic action of binary metal mixtures of copper, manganese and nickel to *Paronychiurus kimi* (Collembola). *Ecotoxicol Environ Saf* 132:164-169.

Spry DJ, Wood CM. 1985. Ion Flux Rates, Acid-Base Status, and Blood Gases in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*, Exposed to Toxic Zinc in Natural Soft Water. *Can J Fish Aquat Sci* 42:1332-1341.

Statsoft. 2004. Statistica, v. 07. www.statsoft.com.

Steffens C, Klauck CR, Benvenuti T, Silva LB, Rodrigues MA. 2015. Water quality assessment of the Sinos River - RS, Brazil. *Braz J Biol* 75:S62-567.

USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. 2002a. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Washington, DC, 266 pp.

USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. 2002b. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Washington, DC, 335 pp.

USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. 2018. Final Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Aluminum. Washington D.C., USA, 161 pp.

Vaananen K, Leppanen MT, Chen X, Akkanen J. 2018. Metal bioavailability in ecological risk assessment of freshwater ecosystems: From science to environmental management. *Ecotoxicol Environ Saf* 147:430-446.

Villarroel MJ, Ferrando MD, Sancho E, Andreu E. 1999. *Daphnia magna* feeding behavior after exposure to tetradifon and recovery from intoxication. *Ecotoxicol Environ Saf* 44:40-46.

Weber P, Behr ER, Knorr CDL, Vendruscolo DS, Flores EMM, Dressler VL, Baldisserotto B. 2013. Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchem J* 106:61-66.

Wee SY, Aris AZ, Yusoff FM, Praveena SM. 2019. Occurrence and risk assessment of multiclass endocrine disrupting compounds in an urban tropical river and a proposed risk management and monitoring framework. *Sci Total Environ* 671:431-442.

Wentzel RS, LaPoint TW, Simini M, Checkail RT, Ludwig D, Brewer L - 1996. Tri-service Procedural Guidelines for Ecological Risk Assessment. US Army Edgewood Research, Development, and Engineering Center, Aberdeen Proving Ground, MD. 108 pp.

Zatta P, Kiss T, Suwalsky M, Berthon G. 2002. Aluminium(III) as a promoter of cellular oxidation. *Coord Chem Rev* 228:271-284.

Zatta P, Lain E, Cagnolini C. 2000. Effects of aluminum on activity of krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate. *Eur J Biochem* 267:3049-3055.

Supporting information

Figure S1. Calibration curve of zinc (A) and aluminum (B) obtained flame atomic absorption spectrometry (PerkinElmer PinAAcle 900 T, USA). Zn was quantified using 213.86 nm absorption lines, 0.7 nm slit width, with flame stoichiometry of 10.0 L min⁻¹ of synthetic air and 2.5 L min⁻¹ of acetylene; while Al was quantified using 309.27 nm absorption lines, 0.7 nm slit width, with flame stoichiometry of 6.0 L min⁻¹ of nitrous oxide and 7.5 L min⁻¹ of acetylene.

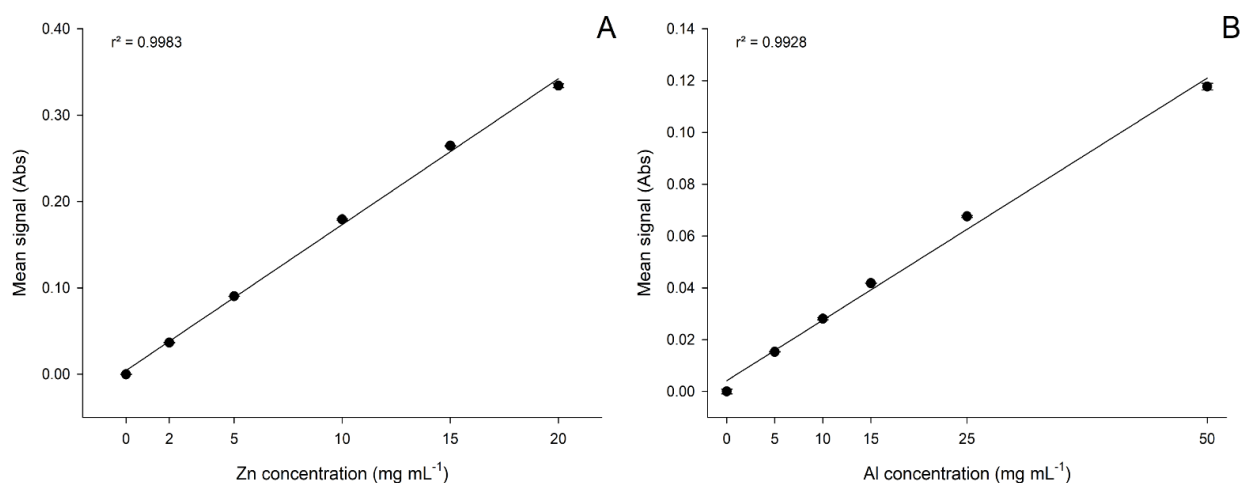


Table S1. Nominal and measured concentrations of the stock solutions of zinc (A) and aluminum (B), quantified by flame atomic absorption spectrometry (PerkinElmer PinAAcle 900 T, USA).

Compound	Nominal concentration (mg metal L ⁻¹)	Measured concentration (mg metal L ⁻¹)	Variation (%)
Zinc (ZnCl ₂)	1000.00	961.50 ± 1.23	3.85
Aluminum (AlCl ₃)	1000.00	1087.00 ± 14.00	8.70

Table S2. Water parameters from acute (48h) and chronic (7-d) toxicity tests of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al.

Toxicity test	Zn (mg L ⁻¹)	pH		Hardness (mg CaCO ₃ L ⁻¹)
		(0 h)	(48 h)	
Acute (48 h)	0	7.40	7.49	48.0
	0.125	7.28	7.52	-
	0.150	7.24	7.47	-
	0.200	7.24	7.50	-
	0.300	7.21	7.51	-
	0.400	7.22	7.49	-
Chronic (7-d)	0	7.59	7.70	48.0
	0.02	7.55	7.73	-
	0.04	7.52	7.72	-
	0.06	7.49	7.70	-
	0.08	7.47	7.69	-
	0.10	7.45	7.70	-

Toxicity test	Al (mg L ⁻¹)	pH		Hardness (mg CaCO ₃ L ⁻¹)
		(0 h)	(48 h)	
Acute (48 h)	0	7.26	7.79	46.5
	0,3	7.22	7.78	-
	0,4	7.25	7.74	-
	0,5	7.26	7.72	-
	0,6	7.17	7.69	-
	0,75	7.11	7.70	-
Chronic (7-d)	0	7.59	7.70	48.0
	0.1	7.53	7.73	-
	0.2	7.52	7.75	-
	0.3	7.50	7.77	-
	0.4	7.48	7.81	-
	0.5	7.45	7.82	-

Table S3. Speciation of zinc (Zn) in test solutions, predicted by MINEQL⁺ 4.6.3.2 software.

Toxicity test	Total Zn added		Zn ²⁺		ZnSO _{4(aq)}		ZnOH ⁺		ZnCO _{3(aq)}	
	(mg L ⁻¹)	(mol L ⁻¹)	(mol L ⁻¹)	(%)	(mol L ⁻¹)	(%)	(mol L ⁻¹)	(%)	(mol L ⁻¹)	(%)
Acute (48 h)	0.125	1.91 E-06	1.70 E-06	89.2	1.54 E-07	8.0	3.51 E-08	1.8	0	0
	0.150	2.29 E-06	2.05 E-06	89.3	1.84 E-07	8.1	4.02 E-08	1.8	0	0
	0.200	3.06 E-06	2.73 E-06	89.2	2.46 E-07	8.0	5.49 E-08	1.8	0	0
	0.300	4.59 E-06	4.11 E-06	89.4	3.70 E-07	8.1	7.71 E-08	1.7	0	0
	0.400	6.12 E-06	5.48 E-06	89.5	4.94 E-07	8.1	1.01 E-07	1.6	0	0
Filtration and Chronic (7-d)	0.02	3.06 E-07	2.65 E-07	86.5	2.38 E-08	7.8	9.90 E-09	3.2	5.36 E-09	1.8
	0.04	6.12 E-07	5.31 E-07	86.8	4.77 E-08	7.8	1.90 E-08	3.1	9.81 E-09	1.6
	0.06	9.18 E-07	7.99 E-07	87.1	7.19 E-08	7.8	2.73 E-08	3.0	1.35 E-08	1.5
	0.08	1.22 E-06	1.06 E-06	87.2	9.56 E-08	7.8	3.55 E-08	2.9	1.71 E-08	1.4
	0.10	1.53 E-06	1.34 E-06	87.3	1.20 E-07	7.9	4.35 E-08	2.8	2.05 E-08	1.3

Table S4. Speciation of aluminum (Al) in test solutions, predicted by MINEQL⁺ 4.6.3.2 software.

Toxicity test	Total Al added		Al(OH) ₄ ⁻		Al(OH) _{3(aq)}	
	(mg L ⁻¹)	(mol L ⁻¹)	(mol L ⁻¹)	(%)	(mol L ⁻¹)	(%)
Acute (48 h)	0.30	1.11 E-05	1.08 E-05	97.1	2.71 E-07	2.4
	0.40	1.48 E-05	1.44 E-05	97.0	3.70 E-07	2.5
	0.50	1.85 E-05	1.80 E-05	97.0	4.62 E-07	2.5
	0.60	2.22 E-05	2.14 E-05	96.5	6.33 E-07	2.9
	0.75	2.78 E-05	2.68 E-05	96.4	8.29 E-07	3.0
Filtration and Chronic (7-d)	0.10	3.71 E-06	3.64 E-06	98.1	6.19 E-08	1.7
	0.20	7.41 E-06	7.28 E-06	98.2	1.18 E-07	1.6
	0.30	1.11 E-05	1.09 E-05	98.2	1.81 E-07	1.6
	0.40	1.48 E-05	1.45 E-05	98.3	2.31 E-07	1.6
	0.50	1.85 E-05	1.82 E-05	98.2	2.95 E-07	1.6

Table S5. Speciation of elements of the artificial water, predicted by MINEQL⁺ 4.6.3.2 software*

Element	(mol L ⁻¹)	(%)
Na ⁺	5.69 E-04	99.7
K ⁺	2.67 E-05	99.6
Mg ²⁺	4.71 E-04	92.9
Ca ²⁺	2.01 E-04	91.2
Cl ⁻	2.68 E-05	100
SO ₄ ²⁻	6.71 E-04	92.3

* The speciation of the elements was also predicted for the test solutions containing Zn and Al. The results were the same from the artificial water without metal addition.

Table S6. Water parameters from toxicity tests of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al mixtures (ingestion rates experiments).

Zn (mg L ⁻¹)	Al (mg L ⁻¹)	pH		Hardness (mg CaCO ₃ L ⁻¹)
		(0 h)	(24 h)	
0	0	7.66	7.7	48.0
0.02	0	7.57	7.69	-
0.04	0	7.64	7.71	-
0.06	0	7.65	7.69	-
0.08	0	7.65	7.69	-
0.10	0	7.65	7.67	-
0	0.10	7.68	7.68	-
0	0.20	7.68	7.68	-
0	0.30	7.68	7.69	-
0	0.40	7.67	7.69	-
0	0.50	7.66	7.68	-
0.02	0.10	7.63	7.68	-
0.02	0.20	7.63	7.69	-
0.02	0.30	7.62	7.68	-
0.02	0.40	7.62	7.68	-
0.02	0.50	7.61	7.68	-
0.04	0.10	7.61	7.76	-
0.04	0.20	7.61	7.75	-
0.04	0.30	7.61	7.73	-
0.04	0.40	7.61	7.76	-
0.04	0.50	7.61	7.74	-
0.06	0.10	7.62	7.77	-
0.06	0.20	7.61	7.76	-
0.06	0.30	7.61	7.76	-
0.06	0.40	7.61	7.75	-
0.06	0.50	7.61	7.75	-
0.08	0.10	7.61	7.77	-
0.08	0.20	7.61	7.75	-
0.08	0.30	7.59	7.74	-
0.08	0.40	7.61	7.75	-
0.08	0.50	7.6	7.74	-
0.10	0.10	7.61	7.74	-
0.10	0.20	7.6	7.74	-
0.10	0.30	7.6	7.75	-
0.10	0.40	7.59	7.74	-
0.10	0.50	7.59	7.73	-

Table S7. Number of neonates of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al, during chronic toxicity tests.

Zinc (mg L ⁻¹)	Neonates per female	Aluminum (mg L ⁻¹)	Neonates per female
0	22	0	22
0	25	0	25
0	18	0	18
0	23	0	23
0	23	0	23
0	20	0	20
0	26	0	26
0	23	0	23
0	21	0	21
0	23	0	23
0.02	22	0.10	18
0.02	20	0.10	17
0.02	13	0.10	20
0.02	18	0.10	24
0.02	21	0.10	21
0.02	21	0.10	11
0.02	20	0.10	17
0.02	21	0.10	23
0.02	17	0.10	10
0.02	27	0.10	11
0.04	21	0.20	30
0.04	21	0.20	13
0.04	10	0.20	14
0.04	19	0.20	20
0.04	14	0.20	4
0.04	13	0.20	19
0.04	18	0.20	23
0.04	14	0.20	3
0.04	20	0.20	5
0.04	16	0.20	18
0.06	10	0.30	11
0.06	*	0.30	11
0.06	20	0.30	13
0.06	16	0.30	12
0.06	16	0.30	17
0.06	18	0.30	14
0.06	9	0.30	14
0.06	18	0.30	17
0.06	19	0.30	22
0.06	17	0.30	21
0.08	18	0.40	0
0.08	16	0.40	6
0.08	*	0.40	1
0.08	*	0.40	16
0.08	*	0.40	10
0.08	16	0.40	9
0.08	23	0.40	15
0.08	6	0.40	10
0.08	15	0.40	10
0.08	*	0.40	*
0.10	*	0.50	4
0.10	3	0.50	4
0.10	*	0.50	*
0.10	*	0.50	*
0.10	*	0.50	*
0.10	*	0.50	*
0.10	*	0.50	5
0.10	*	0.50	4
0.10	*	0.50	0
0.10	9	0.50	1

* the organism died before the 7th day

Table S8. Water parameters from acute toxicity tests of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al mixtures (immobility experiments).

Zn (mg L ⁻¹)	Al (mg L ⁻¹)	pH		Hardness (mg CaCO ₃ L ⁻¹)
		(0 h)	(48 h)	
0	0	7.28	7.48	42.0
0.125	0	7.18	7.58	-
0.150	0	7.17	7.61	-
0.200	0	7.14	7.65	-
0.300	0	7.11	7.58	-
0.400	0	7.04	7.56	-
0	0.300	7.06	7.66	-
0	0.400	7.05	7.66	-
0	0.500	7.02	7.68	-
0	0.600	6.96	7.65	-
0	0.750	6.92	7.67	-
0.125	0.300	7.2	7.63	-
0.125	0.400	6.98	7.63	-
0.125	0.500	6.98	7.62	-
0.125	0.600	6.97	7.68	-
0.125	0.750	6.95	7.55	-
0.150	0.300	6.98	7.56	-
0.150	0.400	6.98	7.59	-
0.150	0.500	6.98	7.6	-
0.150	0.600	6.93	7.62	-
0.150	0.750	7.08	7.73	-
0.200	0.300	7.18	7.75	-
0.200	0.400	7.18	7.73	-
0.200	0.500	7.11	7.74	-
0.200	0.600	7.12	7.73	-
0.200	0.750	7.07	7.74	-
0.300	0.300	7.08	7.72	-
0.300	0.400	7.08	7.72	-
0.300	0.500	7.07	7.72	-
0.300	0.600	7.06	7.72	-
0.300	0.750	6.92	7.72	-
0.400	0.300	6.95	7.68	-
0.400	0.400	6.94	7.68	-
0.400	0.500	6.92	7.68	-
0.400	0.600	6.93	7.71	-
0.400	0.750	6.91	7.71	-

Table S9. Summary table for interpretation of the parameters substituted in IA (independent action) model, adapted from Jonker (2005). Where S/A = synergism/antagonism; DR = dose ratio dependence; DL = dose level dependence.

Deviation	Parameter	Value	Interpretation
S/A	a	> 0	Antagonism
		< 0	synergism
DR	a	> 0	Antagonism. Exception: mixture ratios where a significant negative b value indicates synergism
		< 0	Synergism. Exception: mixture ratios where a significant positive b value indicates antagonism
	b_i	> 0	Antagonism, the toxicity of the mixture is caused mainly by toxicant i
		< 0	Synergism, the toxicity of the mixture is caused mainly by toxicant i
DL	a	> 0	Antagonism at low dose level; synergism at high dose level
		< 0	Synergism at low dose level; antagonism at high dose level
	b_{DL}	> 2	The change occurs at lower dose level than EC_{50}
		$= 2$	The change occurs at EC_{50}
		$1 < b_{DL} < 2$	The change occurs at higher dose level than EC_{50}
	< 1	No change, but the magnitude of S/A is effect level dependent	

Table S10. Assessment of ingestion rates (mean \pm standard deviation) of *Ceriodaphnia silvestrii* in mixtures of zinc (Zn) and aluminum (Al). Results from mixture treatments presented in bold were statistically different ($p < 0.05$, One-way ANOVA, Tukey test) from control or from single metals exposure. Observed effects higher than predicted effects indicates antagonism (A), while observed effects lower than the predicted effects indicates synergism (S).

Zn (mg L ⁻¹)	Al (mg L ⁻¹)	Ingestion rate (x 10 ⁴ cells ind ⁻¹ h ⁻¹)				Effect - modeled data		
		Control	Zinc	Aluminum	Mixture	Predicted	Observed	Effect
0.02	0.10	1.36 \pm 0.23	1.35 \pm 0.15	0.86 \pm 0.16	1.40 \pm 0.38	0.63	1.03	-
0.02	0.20	1.36 \pm 0.23	1.35 \pm 0.15	1.06 \pm 0.33	1.15 \pm 0.06	0.78	0.84	-
0.02	0.30	1.36 \pm 0.23	1.35 \pm 0.15	1.00 \pm 0.13	1.30 \pm 0.21	0.73	0.96	-
0.02	0.40	1.36 \pm 0.23	1.35 \pm 0.15	0.73 \pm 0.13	0.91 \pm 0.13	0.53	0.67	A
0.02	0.50	1.36 \pm 0.23	1.35 \pm 0.15	0.20 \pm 0.09	0.64 \pm 0.15	0.15	0.47	A
0.04	0.10	1.36 \pm 0.23	1.54 \pm 0.11	0.86 \pm 0.16	1.10 \pm 0.14	0.72	0.81	A
0.04	0.20	1.36 \pm 0.23	1.54 \pm 0.11	1.06 \pm 0.33	0.87 \pm 0.11	0.89	0.64	S
0.04	0.30	1.36 \pm 0.23	1.54 \pm 0.11	1.00 \pm 0.13	1.14 \pm 0.43	0.84	0.84	-
0.04	0.40	1.36 \pm 0.23	1.54 \pm 0.11	0.73 \pm 0.13	1.20 \pm 0.62	0.61	0.88	-
0.04	0.50	1.36 \pm 0.23	1.54 \pm 0.11	0.20 \pm 0.09	0.58 \pm 0.06	0.17	0.43	A
0.06	0.10	1.36 \pm 0.23	1.51 \pm 0.23	0.86 \pm 0.16	0.77 \pm 0.12	0.71	0.57	S
0.06	0.20	1.36 \pm 0.23	1.51 \pm 0.23	1.06 \pm 0.33	1.00 \pm 0.07	0.87	0.74	-
0.06	0.30	1.36 \pm 0.23	1.51 \pm 0.23	1.00 \pm 0.13	0.72 \pm 0.10	0.82	0.53	S
0.06	0.40	1.36 \pm 0.23	1.51 \pm 0.23	0.73 \pm 0.13	1.11 \pm 0.12	0.60	0.82	-
0.06	0.50	1.36 \pm 0.23	1.51 \pm 0.23	0.20 \pm 0.09	0.78 \pm 0.26	0.16	0.57	A
0.08	0.10	1.36 \pm 0.23	1.83 \pm 0.18	0.86 \pm 0.16	1.76 \pm 0.37	0.86	1.30	A
0.08	0.20	1.36 \pm 0.23	1.83 \pm 0.18	1.06 \pm 0.33	1.28 \pm 0.28	1.05	0.94	-
0.08	0.30	1.36 \pm 0.23	1.83 \pm 0.18	1.00 \pm 0.13	1.41 \pm 0.19	0.99	1.04	-
0.08	0.40	1.36 \pm 0.23	1.83 \pm 0.18	0.73 \pm 0.13	1.38 \pm 0.41	0.72	1.01	-
0.08	0.50	1.36 \pm 0.23	1.83 \pm 0.18	0.20 \pm 0.09	1.31 \pm 0.07	0.20	0.97	A
0.10	0.10	1.36 \pm 0.23	1.29 \pm 0.05	0.86 \pm 0.16	1.22 \pm 0.17	0.60	0.90	-
0.10	0.20	1.36 \pm 0.23	1.29 \pm 0.05	1.06 \pm 0.33	1.26 \pm 0.09	0.74	0.93	-
0.10	0.30	1.36 \pm 0.23	1.29 \pm 0.05	1.00 \pm 0.13	1.43 \pm 0.18	0.70	1.06	-
0.10	0.40	1.36 \pm 0.23	1.29 \pm 0.05	0.73 \pm 0.13	1.03 \pm 0.10	0.51	0.76	-
0.10	0.50	1.36 \pm 0.23	1.29 \pm 0.05	0.20 \pm 0.09	0.89 \pm 0.05	0.14	0.65	A

Table S11. (Continuation)

One-Way Analysis of Variance												One-Way Analysis of Variance											
Data source: Data 1 in Notebook1												Data source: Data 1 in Notebook1											
Normality Test: Passed (P = 0.739)												Normality Test: Passed (P = 0.573)											
Equal Variance Test: Passed (P = 0.573)												Equal Variance Test: Passed (P = 0.573)											
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM							Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM						
Cell 1	3	0	12751.071	2234.814	1168.905							Cell 1	3	0	12751.071	2234.814	1168.905						
Cell 2	3	0	15114.268	2241.657	1151.943							Cell 2	3	0	15114.268	2241.657	1151.943						
Cell 3	3	0	16824.827	924.197	561.424							Cell 3	3	0	16824.827	924.197	561.424						
Cell 4	3	0	15581.85	977.413	582.389							Cell 4	3	0	15581.85	977.413	582.389						
Between Groups	3	1146794.289	38823472.096	11212	0.863						Between Groups	3	15927982.864	5317272487	6599	0.604							
Residual	11	2213112.738	13948971.513								Residual	11	2020826.268	1516126.268									
Total	14	4361107.027									Total	14	36136245.132										
The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.004).												The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.004).											
Power of performed test with alpha = 0.05: 0.948												Power of performed test with alpha = 0.05: 0.948											
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)												All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)											
Completions for Factor												Completions for Factor											
Comparison	Diff of Means	P	α	P	P=0.05						Comparison	Diff of Means	P	α	P	P=0.05							
Cell 1 vs Cell 2	2363.197	0.001	0.001	Yes							Cell 1 vs Cell 2	2363.197	0.001	0.001	Yes								
Cell 1 vs Cell 3	4055.756	0.000	0.000	Yes							Cell 1 vs Cell 3	4055.756	0.000	0.000	Yes								
Cell 1 vs Cell 4	2826.977	0.001	0.001	Yes							Cell 1 vs Cell 4	2826.977	0.001	0.001	Yes								
Cell 2 vs Cell 3	1711.091	0.000	0.000	Yes							Cell 2 vs Cell 3	1711.091	0.000	0.000	Yes								
Cell 2 vs Cell 4	302.389	0.000	0.000	Yes							Cell 2 vs Cell 4	302.389	0.000	0.000	Yes								
Cell 3 vs Cell 4	1711.091	0.000	0.000	Yes							Cell 3 vs Cell 4	1711.091	0.000	0.000	Yes								
A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that includes that comparison. For example, if you had four means tested in order, and found no difference between means 1 vs. 2, then you would not test 1 vs. 3, 1 vs. 4, and 2 vs. 3, 2 vs. 4, and 1 vs. 4 vs. 2 vs. 3 vs. 4. This is because if you find no significant difference between two means, then there is no need to test other comparisons involving those two means.												A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that includes that comparison. For example, if you had four means tested in order, and found no difference between means 1 vs. 2, then you would not test 1 vs. 3, 1 vs. 4, and 2 vs. 3, 2 vs. 4, and 1 vs. 4 vs. 2 vs. 3 vs. 4. This is because if you find no significant difference between two means, then there is no need to test other comparisons involving those two means.											

Table S11. (Continuation)

One Way Analysis of Variance					sesta-feira, março 13, 2020, 18:03:41	
Data source: Data 1 in Notebook1						
Normality Test: Passed (P = 0.313)						
Equal Variance Test: Passed (P = 0.420)						
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
Col 1	3	0	13571.057	2334.814	1348.005	
Col 6	3	0	12855.319	470.962	271.737	
Col 11	3	0	1987.510	936.149	540.486	
Col 36	3	0	8880.331	513.271	296.337	
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P	
Between Groups	3	253585939.539	84528646.513	49.630	<0.001	
Residual	8	13625397.672	1703174.709			
Total	11	267211337.211				
The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).						
Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000						
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):						
Comparisons for factor:						
Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050	
Col 1 vs. Col 11	11583.548	4	15.573	<0.001	Yes	
Col 1 vs. Col 36	4690.726	4	6.235	0.010	Yes	
Col 1 vs. Col 6	715.738	4	0.950	0.905	No	
Col 6 vs. Col 11	10867.810	4	14.424	<0.001	Yes	
Col 6 vs. Col 36	-3974.988	4	5.276	0.024	Yes	
Col 36 vs. Col 11	6892.822	4	9.148	0.001	Yes	

Table S12. Ingestion rates of *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to Zn and Al mixtures.

Treatments	Zn (mg/L)	Al (mg/L)	Ingestion rates (cells ind ⁻¹ h ⁻¹)	Treatments	Zn (mg/L)	Al (mg/L)	Ingestion rates (cells ind ⁻¹ h ⁻¹)
Control			1.62E+04	Mixtures			1.62E+04
T1	0	0	1.18E+04	T19	0.04	0.30	7.70E+03
			1.27E+04				1.03E+04
Single Zn			1.52E+04	T20	0.04	0.40	1.64E+04
T2	0.02	0	1.27E+04				4.85E+03
			1.27E+04				1.48E+04
			1.64E+04	T21	0.04	0.50	6.47E+03
T3	0.04	0	1.55E+04				5.46E+03
			1.43E+04				5.55E+03
			1.75E+04	T22	0.06	0.10	9.09E+03
T4	0.06	0	1.50E+04				6.94E+03
			1.29E+04				7.09E+03
			1.71E+04	T23	0.06	0.20	1.07E+04
T5	0.08	0	2.03E+04				9.36E+03
			1.73E+04				9.97E+03
			1.24E+04	T24	0.06	0.30	6.42E+03
T6	0.10	0	1.33E+04				8.30E+03
			1.29E+04				6.89E+03
Single Al			8.24E+03	T25	0.06	0.40	1.24E+04
T7	0	0.10	1.04E+04				1.00E+04
			7.29E+03				1.08E+04
			1.00E+04	T26	0.06	0.50	8.48E+03
T8	0	0.20	7.65E+03				4.90E+03
			1.42E+04				1.00E+04
			1.04E+04	T27	0.08	0.10	1.34E+04
T9	0	0.30	8.57E+03				2.02E+04
			1.11E+04				1.93E+04
			7.04E+03	T28	0.08	0.20	1.60E+04
T10	0	0.40	6.09E+03				1.12E+04
			8.68E+03				1.12E+04
			1.42E+03	T29	0.08	0.30	1.55E+04
T11	0	0.50	3.07E+03				1.19E+04
			1.48E+03				1.48E+04
Mixtures			1.19E+04	T30	0.08	0.40	1.73E+04
T12	0.02	0.10	1.17E+04				1.47E+04
			1.83E+04				9.32E+03
			1.15E+04	T31	0.08	0.50	1.35E+04
T13	0.02	0.20	1.21E+04				1.35E+04
			1.08E+04				1.23E+04
			1.17E+04	T32	0.10	0.10	1.27E+04
T14	0.02	0.30	1.20E+04				1.04E+04
			1.55E+04				1.36E+04
			9.82E+03	T33	0.10	0.20	1.36E+04
T15	0.02	0.40	9.87E+03				1.24E+04
			7.55E+03				1.18E+04
			4.98E+03	T34	0.10	0.30	1.52E+04
T16	0.02	0.50	6.31E+03				1.55E+04
			8.01E+03				1.22E+04
			9.47E+03	T35	0.10	0.40	1.15E+04
T17	0.04	0.10	1.19E+04				9.81E+03
			1.18E+04				9.70E+03
			9.57E+03	T36	0.10	0.50	9.27E+03
T18	0.04	0.20	9.00E+03				8.30E+03
			7.46E+03				9.07E+03

Table S13. Measured environmental concentrations (MECs) of zinc (Zn) in Brazilian freshwater ecosystems. Where: Flame-AAS = flame atomic absorption spectrometry; GFAAS = graphite furnace atomic absorption spectrometer; ICP-MS = inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-OES = inductively coupled plasma optical emission spectrometry.

Site	Quantification (mg Zn L ⁻¹)	Determination method	Reference
Pardo river	0.0116	ICP-MS	Alves (2014)
Pardo river	0.0133	ICP-MS	Alves (2014)
Pardo river	0.0120	ICP-MS	Alves (2014)
Pardo river	0.0131	ICP-MS	Alves (2014)
Extremoz lake	0.1100	Flame-AAS	Barbosa (2010)
Extremoz lake*	0.2360	Flame-AAS	Barbosa (2010)
Extremoz lake	0.0440	Flame-AAS	Barbosa (2010)
Extremoz lake	0.1280	Flame-AAS	Barbosa (2010)
Extremoz lake*	0.5100	Flame-AAS	Barbosa (2010)
Sinos river	0.0100	-	Bianchi (2019)
Sinos river	0.0200	-	Bianchi (2019)
Sinos river	0.0100	-	Bianchi (2019)
Sinos river	0.0300	-	Bianchi (2019)
Sinos river	0.0100	-	Bianchi (2019)
Ilha river	0.0200	GFAAS	Dalzochio (2017)
Ilha river	0.0200	GFAAS	Dalzochio (2017)
Pampulha lake	0.0181	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0284	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0052	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0146	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0186	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0091	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0144	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0158	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0108	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0059	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)

Table S13. (Continuation)

Site	Quantification (mg Zn L ⁻¹)	Determination method	Reference
Pampulha lake	0.0094	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0045	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0045	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0069	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0036	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0085	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0048	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0043	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0058	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0033	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0091	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0059	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0036	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0044	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pampulha lake	0.0022	ICP-OES/ ICP-MS	Friese (2010)
Pardo river	0.0093	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0126	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0089	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0178	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0143	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0750	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.1261	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0644	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.1081	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0797	ICP-MS	Machado (2017)
Todos os Santos river	0.0035	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0091	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0262	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0198	ICP-MS	Pereira (2018)

Table S13. (Continuation)

Site	Quantification (mg Zn L ⁻¹)	Determination method	Reference
Todos os Santos river	0.0146	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0081	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0238	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0089	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0297	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0402	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0297	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.0173	ICP-MS	Pereira (2018)
Tietê River	0.0350	-	Rodgher (2005)
Tietê River	0.0120	-	Rodgher (2005)
Piracicaba river*	1.1250	-	Rodgher (2005)
Piracicaba river	0.0150	-	Rodgher (2005)
Barra Bonita dam	0.1190	-	Rodgher (2005)
Barra Bonita dam	0.0020	-	Rodgher (2005)
Bauru river	0.0960	-	Rodgher (2005)
Bauru river	0.0430	-	Rodgher (2005)
Bariri dam	0.0520	-	Rodgher (2005)
Bariri dam	0.0210	-	Rodgher (2005)
Ibitinga dam	0.0420	-	Rodgher (2005)
Ibitinga dam	0.0110	-	Rodgher (2005)
Promissão dam	0.0690	-	Rodgher (2005)
Promissão dam	0.0100	-	Rodgher (2005)
Nova Avanhandava dam	0.0470	-	Rodgher (2005)
Nova Avanhandava dam	0.0090	-	Rodgher (2005)
Três Irmãos dam	0.0750	-	Rodgher (2005)
Três Irmãos dam	0.0120	-	Rodgher (2005)
São João river	0.0130	Flame-AAS	Silva (2017)
São João river	0.0091	Flame-AAS	Silva (2017)

Table S13. (Continuation)

Site	Quantification (mg Zn L ⁻¹)	Determination method	Reference
São João river	0.0237	Flame-AAS	Silva (2017)
São João river	0.1332	Flame-AAS	Silva (2017)
São João river	0.1201	Flame-AAS	Silva (2017)
São João river	0.0162	Flame-AAS	Silva (2017)
São João river	0.0551	Flame-AAS	Silva (2017)
São João river	0.0263	Flame-AAS	Silva (2017)
São João river	0.1400	Flame-AAS	Silva (2017)
São João river	0.0612	Flame-AAS	Silva (2017)
Velhas river	0.0103	ICP-MS	Silva (2018)
Velhas river	0.0201	ICP-MS	Silva (2018)
Velhas river	0.0250	ICP-MS	Silva (2018)
Velhas river	0.0284	ICP-MS	Silva (2018)
São Francisco river	0.0080	Flame-AAS	Souza (2016)
São Francisco river	0.0030	Flame-AAS	Souza (2016)
São Francisco river	0.0130	Flame-AAS	Souza (2016)
Sinos river	0.0033	ICP-OES	Weber (2013)
Sinos river	0.0105	ICP-OES	Weber (2013)
Median value of MECs:	0.0144 mg Zn L ⁻¹		

*These values were excluded from the median calculation, since they are outliers (stepwise Grubb's test, $p < 0.001$)

Table S14. Measured environmental concentrations (MECs) of aluminum (Al) in Brazilian freshwater ecosystems. Where: GFAAS = graphite furnace atomic absorption spectrometer; ICP-MS = inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-OES = inductively coupled plasma optical emission spectrometry.

Site	Quantification (mg Al L ⁻¹)	Determination method	Reference
Sinos river	0.8100	-	Bianchi (2019)
Sinos river	0.6200	-	Bianchi (2019)
Sinos river	1.0000	-	Bianchi (2019)
Sinos river	1.9000	-	Bianchi (2019)
Sinos river *	2.6000	-	Bianchi (2019)
Ilha river	0.9000	GFAAS	Dalzochio (2017)
Ilha river	1.5000	GFAAS	Dalzochio (2017)
Pardo river	0.0346	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0308	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0695	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0946	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.0949	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.6475	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.5262	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.5326	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.6543	ICP-MS	Machado (2017)
Pardo river	0.5453	ICP-MS	Machado (2017)
Todos os Santos river	0.0279	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.4553	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.4471	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.2340	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.7215	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.6900	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.1091	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.2449	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.2725	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river	0.7689	ICP-MS	Pereira (2018)

Table S14. (Continuation)

Site	Quantification (mg Al L ⁻¹)	Determination method	Reference
Todos os Santos river	0.6007	ICP-MS	Pereira (2018)
Todos os Santos river *	2.8318	ICP-MS	Pereira (2018)
Sinos river	1.7000	-	Steffens (2015)
Sinos river	1.2000	-	Steffens (2015)
Sinos river *	3.8000	-	Steffens (2015)
Sinos river	0.7000	-	Steffens (2015)
Sinos river	1.2000	-	Steffens (2015)
Sinos river	0.0357	ICP-OES	Weber (2013)
Sinos river	0.1071	ICP-OES	Weber (2013)
Median value of MECs:	0.5453 mg Al L ⁻¹		

*These values were excluded from the median calculation, since they are outliers (stepwise Grubb's test, $p < 0.05$)

References

- Alves RI, Sampaio CF, Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL, Segura-Munoz SI. 2014. Metal concentrations in surface water and sediments from Pardo River, Brazil: human health risks. *Environ Res* 133:149-155.
- Barbosa JS, Cabral TM, Ferreira DN, Agnez-Lima LF, de Medeiros SR. 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotox Environ Safe* 73:320-325.
- Bianchi E, Dalzochio T, Simões LAR, Rodrigues GZP, da Silva CEM, Gehlen G, do Nascimento CA, Spilki FR, Ziulkoski AL, da Silva LB. 2019. Water quality monitoring of the Sinos River Basin, Southern Brazil, using physicochemical and microbiological analysis and biomarkers in laboratory-exposed fish. *Ecohydrol Hydrobiol* 19:328-338.
- Dalzochio T, Ressel Simoes LA, Santos de Souza M, Prado Rodrigues GZ, Petry IE, Andrigueti NB, Herbert Silva GJ, Gehlen G, Basso da Silva L. 2017. Water quality parameters, biomarkers and metal bioaccumulation in native fish captured in the Ilha River, southern Brazil. *Chemosphere* 189:609-618.
- Friese K, Schmidt G, de Lena JC, Arias Nalini H, Zachmann DW. 2010. Anthropogenic influence on the degradation of an urban lake – The Pampulha reservoir in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Limnologica* 40:114-125.

- Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJM, Bongers M, Kammenga JE. 2005. Significance Testing of Synergistic/Antagonistic, Dose Level–Dependent, or Dose Ratio–Dependent Effects in Mixture Dose–Response Analysis. *Environ Toxicol Chem* 24:2701-2713.
- Machado CS, Fregonesi BM, Alves RIS, Tonani KAA, Sierra J, Martinis BS, Celere BS, Mari M, Schuhmacher M, Nadal M, Domingo JL, Segura-Munoz S. 2017. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. *Environ Sci Pollut Res* 24:20160-20172.
- Pereira CAF, Maia LFO, Faria MCS, Fidencio PH, Bomfeti CA, Barbosa Junior F, Rodrigues JL. 2018. Seasonal variations, metal distribution and water quality in the Todos os Santos River, Southeastern Brazil: a multivariate analysis. *An Acad Bras* 90:2701-2710.
- Rodgher S, Espindola EL, Rocha O, Fracacio R, Pereira RH, Rodrigues MH. 2005. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tiete River (Sao Paulo, Brazil). *Braz J Biol* 65:697-710.
- Silva CP, Silveira EL, Campos SX. 2017. Environmental pollution by heavy metals in the São João River basin, southern Brazil. *Environ Earth Sci* 76:1-10.
- Silva D, Bellato C, Marques Neto J, Fontes M. 2018. Arsenic and trace metals in water and sediment of the Velhas River, Southeastern Iron Quadrangle Region, Minas Gerais, Brazil. *Quím Nova* 49:1011-1018.
- Souza AM, Salviano AM, Melo JF, Felix WP, Belem CS, Ramos PN. 2016. Seasonal study of concentration of heavy metals in waters from lower Sao Francisco River basin, Brazil. *Braz J Biol* 76:967-974.
- Steffens C, Klauck CR, Benvenuti T, Silva LB, Rodrigues MA. 2015. Water quality assessment of the Sinos River - RS, Brazil. *Braz J Biol* 75:S62-567.
- Weber P, Behr ER, Knorr CDL, Vendruscolo DS, Flores EMM, Dressler VL, Baldisserotto B. 2013. Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchem J* 106:61-66.

CAPÍTULO 4

Toxicidade de zinco sobre estágios iniciais de *Danio rerio*: efeitos sobre mortalidade, incorporação de elementos essenciais, comportamento de natação e análise de risco ecológico

Zinc toxicity on initial stages of *Danio rerio*: effects on mortality, incorporation of essential elements, swimming behavior, and ecological risk assessment

Capítulo 4. Toxicidade de zinco sobre estágios iniciais de *Danio rerio*: efeitos sobre mortalidade, incorporação de elementos essenciais, comportamento de natação e análise de risco ecológico

Resumo

Metais essenciais são necessários para a manutenção de processos fisiológicos e bioquímicos dos seres vivos. No entanto, elevadas concentrações desses componentes-traço podem causar toxicidade, de modo que o risco ecológico desses elementos sobre os corpos d'água deve ser estimado. Nosso objetivo foi estudar a toxicidade do zinco (Zn) sobre estágios iniciais de *zebrafish* (*Danio rerio*) por meio de testes de sobrevivência sob concentrações letais, e por meio de testes de comportamento de natação sob concentrações subletais. Além disso, foi realizada análise de risco ecológico (AR) para 3 níveis tróficos, calculando-se quocientes de risco (RQ) com os valores de CL50 para *D. rerio* (presente estudo) e com dados da literatura para uma microalga e um microcrustáceo. Por meio dos testes de letalidade, obtivemos CL50-96h de $24,18 \pm 1,69 \text{ mg L}^{-1}$ e CL10-96h de $11,06 \pm 2,39 \text{ mg L}^{-1}$. Nos experimentos comportamentais, observamos que Zn causou mudanças na natação de *zebrafish*, diminuindo em cerca de 35% a distância percorrida e velocidade de natação em $1,12 \text{ mg L}^{-1}$, o que sugere que o Zn possivelmente pode ter causado algum efeito neurotóxico. Salientamos que se observaram efeitos comportamentais em concentrações cerca de 10 vezes menores que a CL10-96h, demonstrando que a análise comportamental foi um *endpoint* sensível para aferir a toxicidade do Zn. Após 120 h de exposição ao Zn, observamos que em concentrações mais elevadas de Zn houve diminuição da incorporação de elementos essenciais como Ca, Na, K e Cu. Segundo AR, o Zn exerce risco ecológico moderado para *zebrafish* (RQ = 0,60) e alto risco ecológico para microalgas (RQ = 533) e para um cladóceros Neotropical (RQ = 65).

Palavras-chave: análise de risco, alterações de comportamento, incorporação de metal, metal, toxicidade de zinco, *zebrafish*.

1. Introdução

Zinco é um elemento essencial para os seres vivos, por ser um metal requerido em processos fisiológicos e bioquímicos, sendo componente de diversas enzimas. A deficiência de Zn pode levar a efeitos deletérios nos organismos (Banni et al., 2011; Kumar et al., 2020; Maage et al., 2001). No entanto, estudos demonstraram que Zn em concentrações mais elevadas também exerce toxicidade sobre organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos (Cooper et al., 2009; Lu et al., 2017; Wilde et al., 2006; Zheng et al., 2016). Portanto, é importante que concentrações ambientais desse composto sejam monitoradas. No Brasil, o nível máximo permitido é de 0,18 mg Zn L⁻¹ para águas doces de classe 1 (Brazil, 2005), embora estudos de distribuição de sensibilidade de organismos dulcícolas calculem que as concentrações perigosas a 5% dos organismos (HC5, *hazardous concentration*) estão abaixo dessa concentração máxima permitida, variando entre valores de 0,027; 0,062 e 0,158 mg L⁻¹ (Feng et al., 2013; Gebara et al., 2020; Naito et al., 2010). Dessa forma, é importante que se realizem análises de risco ecológico, utilizando como parâmetro as concentrações ambientais de Zn nos corpos d'água brasileiros, visto que a grande gama de análises de risco leva em conta concentrações ambientais de ambientes temperados.

Dentre os organismos-teste utilizados em testes ecotoxicológicos, o peixe-zebra (*Danio rerio*, *zebrafish*), popularmente conhecido como Paulistinha, se destaca como um ótimo indicador em testes de análise de risco ecológico, uma vez que testes com embriões de *zebrafish* (zfe) podem ser utilizados como uma alternativa para algumas categorias de testes com ratos e coelhos (Ducharme et al., 2015), diminuindo a necessidade e o uso de mamíferos em tais testes. Além disso, *D. rerio* tem potencial para estudos de genes relacionados a doenças que afetam seres humanos, haja vista sua alta taxa de homologia genética com humanos (Howe et al., 2013).

Nos últimos anos, é crescente a utilização de testes com zfe, de modo a diminuir ou substituir testes com peixes juvenis e adultos. Diversas são as vantagens na utilização de zfe em testes ecotoxicológicos, uma vez que são de fácil cultivo e possuem alta fecundidade, seu cultivo é de baixo custo, possuem transparência e tempo de desenvolvimento embrionário curto, possuem alta homologia com mamíferos, além de ser um possível substituto a testes com peixes adultos, haja vista que se espera que embriões sejam menos sensíveis a dor e sofrimento durante os testes (Ducharme et al., 2015; Sipes et al., 2011). Estudos demonstram que, em geral, zfe possuem sensibilidade a tóxicos similar a adultos, sendo uma alternativa aos testes de toxicidade aguda com peixes (Alsop & Wood, 2011; Belanger et al., 2013; Lammer et al., 2009).

Um dos mecanismos de toxicidade do Zn descrito para peixes está relacionado à regulação iônica como, por exemplo, alterações na tomada de cálcio (Ca) pelas brânquias (Hogstrand et al., 1994; McRae et al., 2016; Spry & Wood, 1985). Dados sugerem que, em peixes, Zn e Ca possuem uma área de transporte celular na membrana apical do epitélio branquial (Hogstrand et al., 1998); e em larvas de peixe, o transporte possivelmente ocorre no epitélio, via canais de Ca^{2+} (Alsop & Wood, 2011). Sabe-se, ainda, que Zn causa inibição de crescimento e alterações bioquímicas em peixes (Abdel-Tawwab et al., 2016).

Além de testes clássicos de sobrevivência com *D. rerio*, estudos de comportamento são sensíveis para detecção de efeitos de metais, fármacos, pesticidas e nanocompostos (e.g. Almeida et al., 2019; Capriello et al., 2019; Lu et al., 2017; Sarasamma et al., 2018; Senger et al., 2011; Velki et al., 2017; Zhou et al., 2019). Testes comportamentais estão sendo cada vez mais utilizados, devido à sua sensibilidade em detectar efeitos em concentrações subletais, sendo o comportamento de *D. rerio* correlacionado às células da linha lateral e aos músculos (Han et al., 2020). Mudanças comportamentais podem ser indicativo de neurotoxicidade, podendo levar a alterações na direção e na velocidade de locomoção (Kopp et al., 2018; Selderslaghs et al., 2010; Zhang et al., 2022). No entanto, somente parâmetros comportamentais

não são suficientes para afirmar que um composto causou, de fato, efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso de um organismo, sendo importante análises complementares em níveis molecular e estrutural (Fitzgerald et al., 2021). Sabe-se que Zn pode alterar parâmetros comportamentais de *D. rerio*, afetando a locomoção, bem como pode causar genotoxicidade em concentrações subletais, alterando a expressão de genes ligados ao estresse e causar danos ao DNA (Boran & Ulutas, 2016; Lu et al., 2017; Sarasamma et al., 2018).

Com base nisso, este estudo objetivou estudar efeitos de Zn sobre estágios iniciais de *D. rerio* exposto por até 120 h. Analisou-se sobrevivência, incorporação de elementos essenciais e comportamento de natação. Também se realizou análise de risco ecológico, de modo a calcular quocientes de risco (RQ, *risk quotients*) para organismos de 3 níveis tróficos distintos, por meio de dados gerados neste estudo e com complementação de dados de literatura.

2. Material e métodos

Todos os experimentos deste capítulo foram realizados durante doutorado sanduíche na Suíça. Desta forma, os testes realizados com embriões e com larvas seguiram legislação local, citada ao longo desta seção.

2.1. Especiação dos metais

Utilizamos modelo de equilíbrio químico para calcular a especiação do Zn durante os testes de sobrevivência, utilizando software MINEQL+ (ver. 4.6.2.3 (Environmental Research Software)). Por meio dos cálculos, estimou-se as concentrações de íons Zn^{2+} nas soluções teste nas concentrações de 5, 15 e 30 mg L⁻¹.

2.2. Cultivo de zebrafish

Adultos de *Danio rerio* do tipo selvagem (WM) foram obtidos por meio de cruzamento

entre AB, Tübingen e uma população proveniente de um *pet shop* (OBI, Leipzig, Alemanha). Os animais foram cultivados de acordo com condições padronizadas (Westerfield, 2000), que estão de acordo com leis de proteção animal da Suíça. Os peixes foram mantidos em sistemas de recirculação de água (água da torneira: água deionizada, 1:1), com variáveis químicas e físicas da água constantes, a 26 ± 1 °C e num fotoperíodo de 14h/10h claro/escuro. Os adultos de *zebrafish* foram alimentados duas vezes ao dia, por meio de ração floculada (Tetra, Alemanha) e também com oferta de alimento vivo (náuplios de *Artemia salina*). Para os testes de toxicidade, foram instaladas caixas coletoras, com vegetação artificial, de modo a coletar os ovos advindos dos cruzamentos.

2.3. Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade consistiram inicialmente de testes de sobrevivência com concentrações letais de Zn de acordo com normas da OECD (2013) e, ao final dos testes, a incorporação de elementos essenciais foi analisada. Num segundo momento foi realizado teste comportamental onde se analisou a natação de *D. rerio* em concentrações subletais de Zn. Durante ambos os testes, *D. rerio* foi exposto ao Zn desde ovos fecundados (< 1,5 horas pós-fertilização -hpf) até o estágio de larva (até 120 h), compreendendo estágios iniciais de *D. rerio*. Os testes de sobrevivência e comportamentais seguiram normas de proteção animal, de modo que foram utilizados nos experimentos somente estágios iniciais de *D. rerio* (até 5 dias pós fertilização - dpf), sendo estes estágios não protegidos por leis de experimentação animal na Suíça (TSchV Art. 112), convergindo com normativas da União Europeia (Beppi et al., 2021; EU, 2010; Strahle et al., 2012).

2.3.1. Teste de sobrevivência

Primeiramente coletou-se os ovos, os quais foram acondicionados em placas de Petri

contendo água reconstituída. Posteriormente, os ovos foram gentilmente lavados com água de reconstituída. Através de seleção sob esteromicroscópio, os ovos fertilizados em estágio de blástula foram separados dos ovos não fertilizados, já que nesse estágio é possível realizar tal diferenciação (Kimmel et al., 1995; OECD, 2013). Para os testes de toxicidade, utilizou-se água reconstituída diluída numa proporção 1:5 (água reconstituída: água Milli-Q) (OECD, 2013), de modo a simular os ambientes tropicais, nos quais a água possui menores valores de dureza.

Ovos fecundados (< 1,5 hpf) foram expostos a concentrações de 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 mg Zn L⁻¹ de solução-teste. As soluções-teste foram feitas a partir de diluição de solução-estoque de ZnCl₂ na concentração de 1000 mg Zn L⁻¹ (Titrisol®, Merck). Cada embrião foi exposto individualmente às soluções-teste em microplacas de 24 poços, contendo cerca de 1,8-2,0 mL de solução-teste por poço. Foram realizadas 24 e 20 réplicas, respectivamente, para o grupo e para os demais tratamentos (n = 144 embriões por teste). Os testes de mortalidade foram repetidos 3 vezes (n = 432 embriões). Os testes ocorreram em câmara incubadora a 26 ± 1°C, 14h:10h claro: escuro, durante 120 h de exposição. Os animais foram diariamente observados, de modo a se quantificar a mortalidade, caracterizada por coagulação dos ovos fertilizados, ausência de formação de somito, ausência de destacamento da cauda do saco vitelino ou ausência de batimentos cardíacos, (OECD, 2013).

2.3.2. Análise por ICP-MS: testes de incorporação e determinação metálica

Preparação dos organismos

Após os testes de toxicidade descritos no item 2.3.1, as larvas sobreviventes (após 120 h) foram utilizados nos experimentos de aferimento da incorporação de elementos essenciais.

As larvas primeiramente foram anestesiadas em banho contendo gelo. Após isso, foram colocados em uma rede filtradora de nylon com abertura de 100 µm (Corning®, 431752). Os seguintes passos foram realizados: (1) as larvas foram lavadas abundantemente com água

Milli-Q; (2) a rede filtradora foi imersa em uma placa de 6 poços contendo EDTA ($\geq 98,5\%$ *powder*, Sigma Aldrich, ED-100G) na concentração de 4mM por 10 min; (3) as larvas foram lavadas novamente com água Milli-Q; (4) rede filtradora foi imersa em água Milli-Q por 10 min; (5) as larvas foram acondicionadas em frascos tipo Eppendorf de 2 mL de capacidade; (6) a água foi retirada do frasco cuidadosamente, de modo a não danificar as larvas; (7) o peso fresco das larvas foi obtido por meio de balança de precisão; (8) o material foi acondicionado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até procedimento de digestão.

Digestão das amostras

Primeiramente, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. As seguintes etapas foram seguidas: (1) adicionou-se 1 mL de HNO_3 (67-69%, trace metal grade, A509-P1, Fisherscientific); (2) o material biológico foi colocado em tubos de teflon para digestão ácida, adicionando-se HNO_3 para um volume final de 3 mL de ácido; (3) adicionou-se 1 mL de H_2O_2 ; (4) as amostras foram digeridas em equipamento UltraCLAVE (MLS GmbH) a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min; (5) amostras digeridas foram avolumadas para 50 mL, utilizando água Milli-Q.

Aferimento por ICP-MS

As concentrações de metais foram quantificadas por meio de espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) em equipamento 8900 Triple Quadrupole ICP-MS (Agilent). Foram detectadas simultaneamente concentrações de zinco, cálcio, potássio, magnésio, sódio e cobre. Também aferimos a concentração de Zn da solução-estoque e da solução-teste dos testes de sobrevivência (tanto nos tubos de ensaio, quanto nas microplacas de 24 poços, onde os testes de toxicidade ocorreram).

2.3.3. Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados nas mesmas condições laboratoriais dos testes de sobrevivência. Os zfe ($< 1,5$ hpf) foram inicialmente expostos a concentrações ambientalmente relevantes de 0 (controle); 0,002; 0,047 e 1,12 mg Zn L⁻¹ utilizando-se inicialmente 12 réplicas por tratamento ($n = 48$ embriões/teste). As concentrações de Zn foram escolhidas com base num estudo de literatura que reúne medidas de Zn de 100 pontos coletas de corpos d'água brasileiros (Gebara et al., 2021). Visando selecionar as 3 concentrações de solução-teste, utilizamos a menor concentração ambientalmente encontrada de 0,002 mg L⁻¹, a média das concentrações (0,047 mg L⁻¹) e a maior concentração de Zn encontrada (1,12 mg Zn L⁻¹).

Em 120 h, período no qual as larvas já haviam eclodido, analisou-se o comportamento de natação das larvas em sala climatizada a 26 ± 1 °C, por meio de câmara de observação DanioVision (DVOC-0040T; Noldus, Holanda), num total de 87 min de análise e de imagens gravadas. O primeiro parâmetro analisado foi o movimento espontâneo das larvas na presença e ausência de luz: as larvas foram aclimatadas com presença de luz (20min), seguido de período de análise de natação espontânea na presença de luz (20 min). Após isso, houve períodos alternados de análise de natação espontânea no escuro (2 períodos, total de 20 min) e na presença de luz (2 períodos, total de 20 min). O segundo parâmetro analisado foi o movimento das larvas após um estímulo acústico vibracional: as larvas foram expostas a luz por 90s, e após isso receberam quatro vezes um estímulo vibracional, sendo cada estímulo intercalado por um período de 90s de intervalo (Fitzgerald et al., 2019). Os dados de distância percorrida e velocidade de natação foram gravados, processados, analisados e extraídos por meio de software EthoVision XT13 (versão 13.0.1220, Noldus, Holanda).

2.4. Análise de risco ecológico

A análise de risco ecológico foi realizada através de quocientes de riscos (*risk quotient*, RQ), levando-se em conta as concentrações medidas no ambiente (*measured environmental concentrations*, MEC) e concentrações sem efeito previsto (*predicted no-effect concentration*, PNEC), de acordo com Wee et al. (2019).

$$RQ = MEC / PNEC$$

A concentração de MEC do Zn foi retirada da literatura (Gebara et al., 2021). Já a PNEC foi calculada utilizando-se valores de CEx e fatores de avaliação (*assessment factor*, AF):

$$PNEC = ECx / AF$$

O valor de AF foi definido como 1000 para *endpoints* referentes a testes agudos (CE50) com organismos de 3 níveis tróficos; e valores de AF = 50 para avaliação de risco com base nos valores de dados crônicos para organismos de 2 níveis tróficos. Esses valores foram determinados de acordo com guia da *European Chemicals Agency* (ECHA /REACH), disponíveis em normativa da OECD (2011).

Para análise de risco, além de utilizar dados deste estudo com zfe, calculamos os RQs também para a microalga *R. subcapitata* e para o cladóceros *C. silvestrii*, utilizando valores de CI50-72h e CI10-72h (alga – dados do Capítulo 2 desta Tese) e CE50-48h e CE10-7d (cladóceros – dados de Gebara et al. (2021)). Dessa forma, pudemos comparar os RQs de organismos pertencentes a três níveis tróficos distintos.

2.5. Análise dos dados

Os dados foram testados quanto à normalidade por meio de teste de Shapiro-Wilk e, quanto à variância, utilizando-se teste de Levene. Para dados normais, utilizamos análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguida de teste de Dunnett. Os dados não-normais foram logaritmizados na tentativa de atingir normalidade. Para dados que ainda assim permaneceram não-normais, utilizamos teste de Kruskal-Wallis, seguido por teste de Dunn. Para os testes comportamentais, checamos a presença de *outliers* por meio de teste de Dixon. Para todos os testes estatísticos, diferenças significativas foram consideradas para $p < 0,05$. Os cálculos de concentrações letais (CL_x) foram calculados a partir de equações logísticas.

3. Resultados e discussão

3.1. Quantificação de zinco nas soluções-teste e solução-estoque

As soluções-teste foram aferidas tanto nos frascos em que foram diluídas, bem como nas placas multipoços, onde ocorreram os testes (Fig. 1). Segundo análise em ICP-MS, a diferença entre concentrações nominais *vs.* concentrações medidas foi menor que 10% e, portanto, mantivemos as concentrações nominais neste estudo. As medições nos tubos *vs.* as medições nas placas multipoços foram muito similares, indicando que o metal não ficou aderido às placas. Também foi aferida a concentração da solução-estoque de 1000 mg Zn L⁻¹, na qual a diferença também foi menor que 10% entre concentração nominal e a real (Fig. 1).

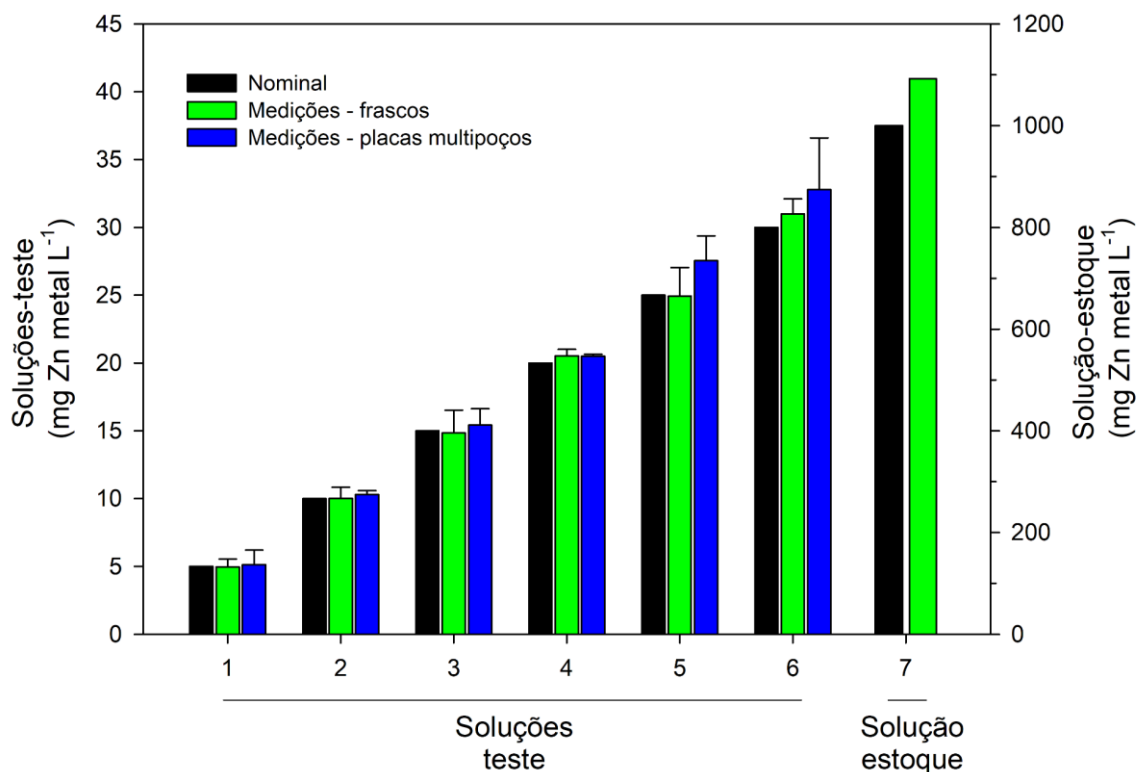


Fig. 1. Medições (valor médio \pm desvio-padrão) das concentrações de zinco (mg Zn L^{-1}) por ICP-MS nas soluções-teste (1 a 6) e na solução-estoque (7). Quanto às soluções-teste, analisou-se as concentrações nos frascos durante as diluições nas placas multipoços, onde os testes de toxicidade ocorreram.

Segundo dados de especiação do Zn, calculado por meio de modelo de equilíbrio químico MINEQL⁺, mais de 90% do total adicionado de Zn estava presente como Zn^{2+} , em todas as soluções-teste analisadas (Tabela 1), estando o restante nas formas de ZnOH^+ , ZnCO_3 e $\text{ZnSO}_{4(\text{aq})}$. A análise de especiação metálica é de extrema importância para entendimento da toxicidade, especialmente para Zn, visto que parte da toxicidade do Zn é atribuída aos íons Zn^{2+} , que competem pela absorção em sítios específicos para absorção de Ca (McRae et al., 2016; Tchounwou et al., 2012).

Tabela 1. Especificação de zinco (Zn) nas soluções-teste, de acordo com predições do software MINEQL⁺.

Zn total	mg L ⁻¹	5	15	30
	mol L ⁻¹	7,65 x 10 ⁻⁵	2,29 x 10 ⁻⁴	4,59 x 10 ⁻⁴
Zn ²⁺	mol L ⁻¹	7,06 x 10 ⁻⁵	2,16 x 10 ⁻⁴	4,38 x 10 ⁻⁴
	%	92,3	94,2	95,5
ZnOH ⁺	mol L ⁻¹	2,56 x 10 ⁻⁶	5,48 x 10 ⁻⁶	7,75 x 10 ⁻⁶
	%	3,3	2,4	1,7
ZnCO ₃	mol L ⁻¹	1,14 x 10 ⁻⁶	-	-
	%	1,5	-	-
ZnSO _{4(aq)}	mol L ⁻¹	1,6 x 10 ⁻⁶	4,68 x 10 ⁻⁶	8,91 x 10 ⁻⁶
	%	2,1	2,0	1,9

3.2. Testes de sobrevivência

Durante os testes de toxicidade, a sobrevivência do grupo controle foi superior a 95% e as taxas de eclosão foram 100% após 96h. As porcentagens de sobrevivência de *D. rerio* ao longo de 120 h estão apresentadas na Fig. 2. Podemos observar diferença significativa (teste de Dunnett, $p < 0,05$) somente a partir de 96 h, nas concentrações de 20, 25 e 30 mg L⁻¹. Em 120 h, pode-se observar que o Zn reduziu a sobrevivência a partir de 15 mg L⁻¹ (teste de Dunnett, $p < 0,05$), chegando a apenas $16,67 \pm 7,64\%$ de sobrevivência na maior concentração testada de 30 mg Zn L⁻¹.

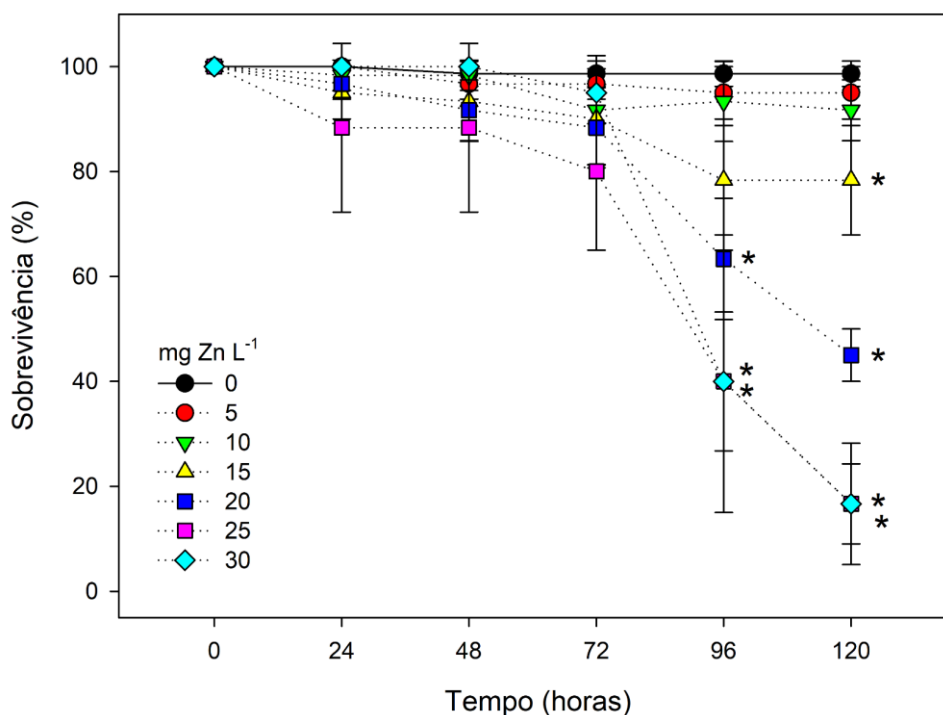


Fig. 2. Sobrevivência (%) de *Danio rerio* exposto ao zinco (mg L^{-1}) ao longo de 120 h. Valores apresentados correspondem à média \pm desvio-padrão. Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA *one-way*, e *post hoc* teste de Dunnett).

A partir dos dados de sobrevivência plotados em curvas logísticas (Fig. 3), calcularam-se os valores de concentração (CL) a 50%, 20% e 10% dos organismos, respectivamente, CL50, CL20 e CL10. Obtivemos CL50-96 h de $24,18 \pm 1,69 \text{ mg L}^{-1}$ e CL50-120 h de $19,50 \pm 0,59 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 2). Estudos com adultos de *D. rerio* reportaram resultados similares, com valores de CL50-96h de $26,4 \text{ mg L}^{-1}$ (Lu et al., 2017) e 30 mg L^{-1} (Zheng et al., 2016). Dados de outros estudos sobre efeitos de Zn sobre *D. rerio* reportaram valores menores de CL50-96h de $4,66 \text{ mg L}^{-1}$ (Boran & Ulutas, 2016), 6 mg L^{-1} (Sarasamma et al., 2018) e $14,02 \text{ mg L}^{-1}$ (Fasmina et al., 2021). Para testes com *D. rerio* com maior duração, observou-se CL50-15d de $1,36 \text{ mg L}^{-1}$ (Küçükoglu et al., 2013).

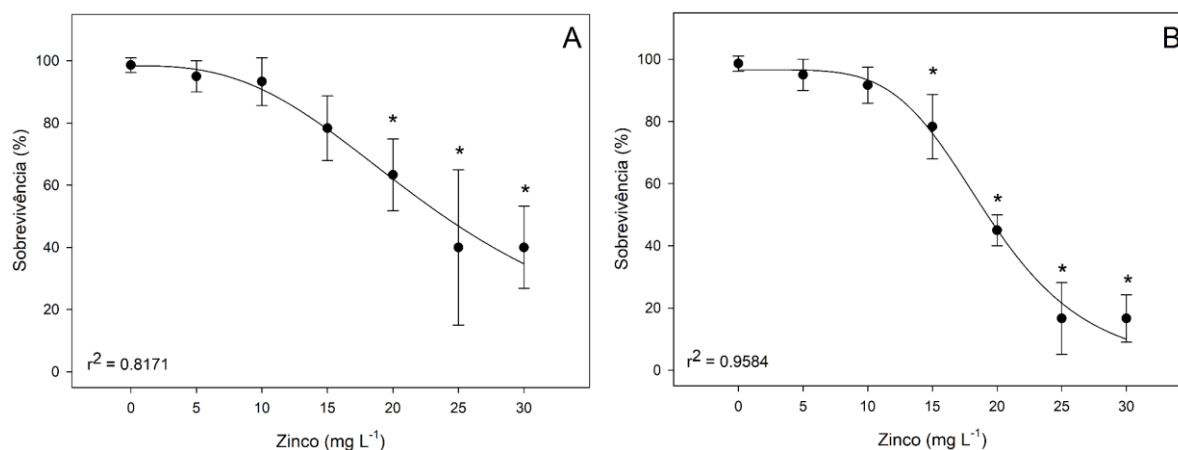


Fig. 3. Curvas logísticas de sobrevivência (%) de *Danio rerio* (mg L⁻¹) em exposição ao zinco, após 96 h (A) e 120 h (B). Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA *one-way*, e *post hoc* teste de Dunnett).

Tabela 2. Concentrações letais (CLx) de *Danio rerio* exposto ao zinco durante 96 e 120 h. Valores (mg L⁻¹) estão representados como valor \pm desvio-padrão (SD). Valores calculados com dados de 3 testes de toxicidade.

Duração teste	CL50 (mg L ⁻¹)	CL20 (mg L ⁻¹)	CL10 (mg L ⁻¹)
120 h	19,50 \pm 0,59	14,80 \pm 0,80	12,59 \pm 0,92
96 h	24,18 \pm 1,69	14,76 \pm 2,21	11,06 \pm 2,39

3.3. Incorporação dos elementos

Após 120 h de exposição de *D. rerio* a concentrações letais e subletais de Zn, foram aferidas as concentrações corporais de Zn, Na, Ca, K, Cu e Mg. Na Fig. 4, estão apresentadas as correlações entre concentração dos elementos vs concentrações de Zn a que os animais foram expostos em meio aquoso.

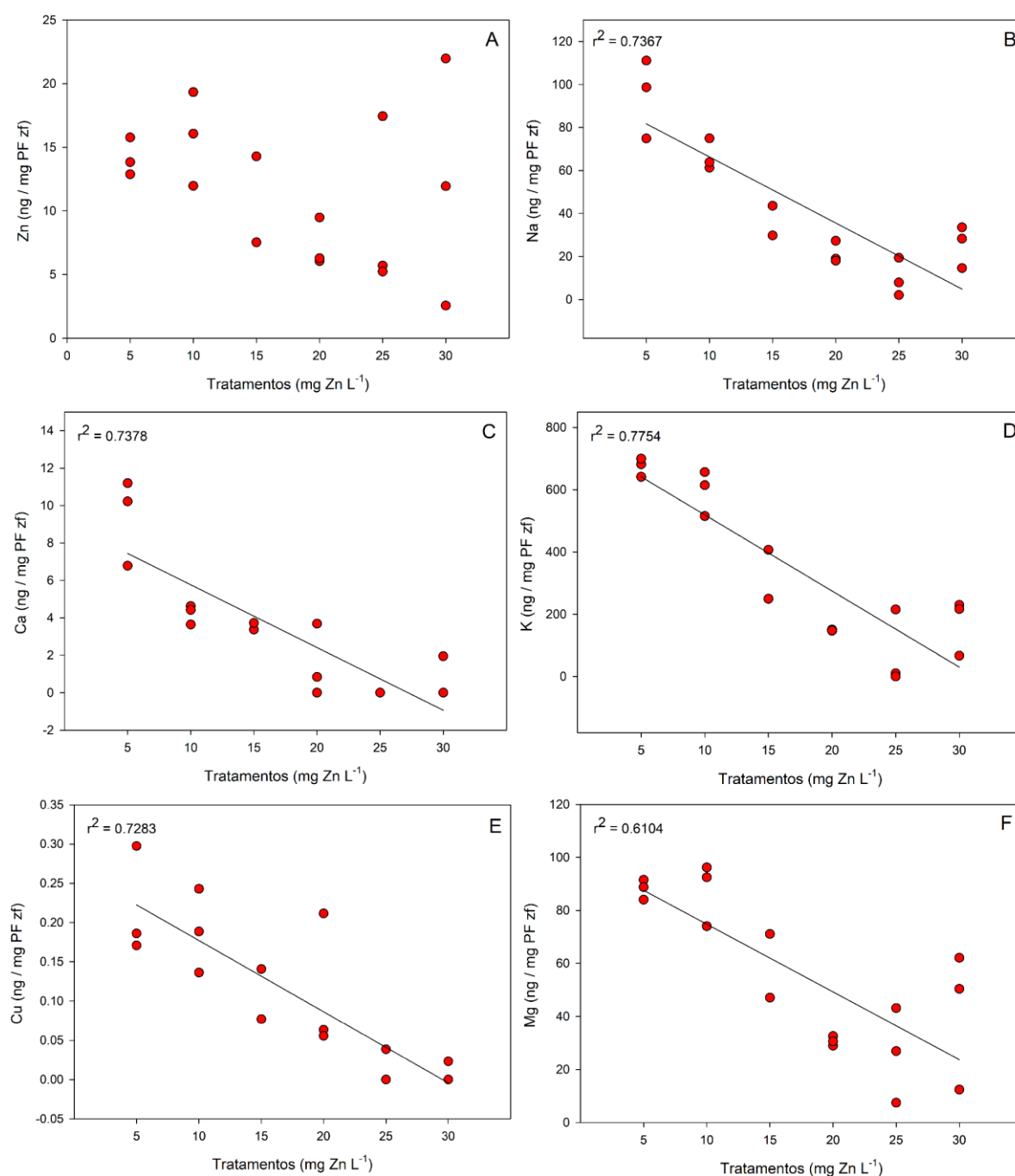


Fig. 4. Correlações entre incorporação de zinco (Zn)-A, sódio (Na)-B, cálcio (Ca)-C, potássio (K)-D, cobre (Cu)-E e magnésio (Mg)-F por estágios iniciais de *Danio rerio* (zebrafish) em exposição ao Zn por 120 h. Os valores de incorporação estão expressos como: ng /mg PF de *D. rerio* (zf), onde PF = peso fresco. Os valores foram aferidos por ICP-MS. Por favor, note que as escalas dos eixos y são diferentes.

Com relação à incorporação do Zn, houve grande variação dos dados, de modo que não foi possível observar tendências (Fig. 4A), não havendo diferenças significativas entre controle e tratamentos (Fig. S2 A). Não observamos tendência de acumulação de Zn, pois

possivelmente as larvas de *D. rerio* excretaram Zn por meio de processos de regulação interna, indo de encontro de estudos que observaram pouca ou nenhuma acumulação significativa de Zn em peixes (Arini et al., 2015; Kamunde & MacPhail, 2011; McRae et al., 2016).

Para os demais elementos aferidos, observamos que quanto maior a concentração de Zn a que os organismos foram expostos, menor a concentração desses elementos, com correlações com $r^2 > 0,70$ para Na, Ca, K e Cu, e $r^2 = 0,61$ para Mg (Fig. 4). Também foi observada diminuição significativa nas concentrações de Na, Ca, K e Cu, com reduções entre 94 a 100% nas maiores concentrações, em comparação ao grupo controle (Fig. S2). A diminuição da tomada desses elementos nas maiores concentrações de Zn pode ter ocorrido por diversos fatores como, por exemplo, diminuição do influxo desses elementos ou até mesmo aumento do efluxo. Sabe-se que Cu é elemento essencial para peixes, estando presente em muitas enzimas e glicoproteínas (Clearwater et al., 2002; Tavares-Dias, 2021). Como o Cu foi um dos elementos mais afetados, hipotetizamos que a diminuição observada na tomada de Cu pode ter levado à disrupção de processos fisiológicos e bioquímicos. Sabe-se também que deficiência de Ca leva à hipocalcemia, podendo causar morte de peixes (McRae et al., 2016).

Nossos dados com estágios iniciais de *D. rerio* corroboram estudos realizados em peixes, em que se observaram que Zn^{2+} inibe a tomada de Ca^{2+} (Hogstrand et al., 1994; Spry & Wood, 1985). Segundo Spry & Wood (1985), Zn causou alteração na regulação iônica em trutas (*Salmo gairdneri*), diminuindo fluxo de Ca, K e Na nas brânquias do animal após 96 h de exposição a $0,8 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ L}^{-1}$. Em estudos com o teleósteo *Galaxias maculatus*, observou-se diminuição de influxo de Ca após exposição a 1 mg L^{-1} por 96 h (McRae et al., 2016). Dessa forma, observa-se padrão similar entre testes com peixes adultos e testes com estágios iniciais de *D. rerio*, no que se refere à diminuição da incorporação de alguns elementos essenciais após exposição ao Zn.

3.4. Testes comportamentais

Os dados de distância percorrida por larvas de *D. rerio* expostas a concentrações ambientalmente relevantes de Zn por 120 h estão representados na Fig. 5. Sabe-se que durante exposição à luz, as larvas possuem baixa movimentação, de modo a representar a atividade basal dos organismos, enquanto que no escuro a atividade aumenta (Velki et al., 2017; Zhang et al., 2022), o que é corroborado pelos dados observados no presente estudo.

Através de observação de nossos dados, pode-se observar que em exposição à luz, o Zn não causou alterações de comportamento durante a atividade basal (Fig. 5 A). Já durante a análise de natação espontânea no escuro, observamos uma tendência de decaimento da distância percorrida com o aumento das concentrações de Zn, de modo que, em 1,12 mg L⁻¹, observou-se decaimento significativo de 35% na distância percorrida (Fig. 5 A) e na velocidade de natação (Fig. 5 B) em relação ao grupo controle (teste de Dunnett, $p < 0,05$). Ressalta-se que foram observados efeitos sobre comportamento de *D. rerio* em 1,12 mg L⁻¹, cerca de 10 vezes mais baixa do que a CL10-96h de 11,06 mg L⁻¹, enfatizando que este *endpoint* é muito sensível. Alterações comportamentais, como mudanças em parâmetros de locomoção, podem ser indicativo de neurotoxicidade (Kopp et al., 2018; Zhang et al., 2022). Nos tratamentos em que houve estímulo sonoro-vibracional (Fig. 5 C e D), não foram observadas diferenças significativas, nem tendências. Outros estudos com adultos de *D. rerio* observaram mudanças comportamentais, como alteração da velocidade de natação, a partir de 3,5 mg L⁻¹ (Lu et al., 2017) e 0,5 mg L⁻¹ (Sarasamma et al., 2018). Estudos também evidenciam que Zn provocou alterações no olfato de *D. rerio* (Heffern et al., 2018; Hentig & Byrd-Jacobs, 2016).

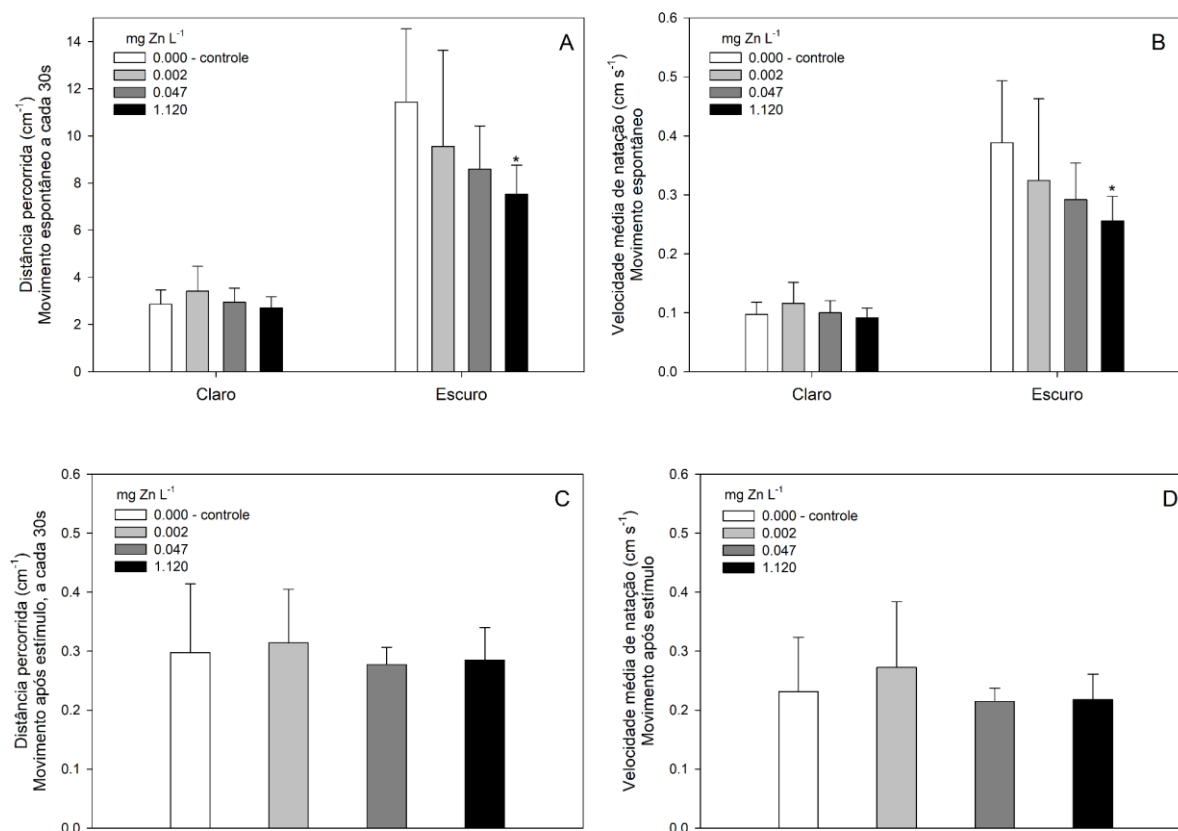


Fig. 5. Análise de natação espontânea de larvas de *Danio rerio* após exposição de 120 h a concentrações de 0; 0,002; 0,047 e 1,12 mg Zn L⁻¹. Analisou-se a distância percorrida de movimentos espontâneos a cada 30s (A), e após estímulo (C); bem como velocidade de natação de movimentos espontâneos a cada 30s (B), e após estímulo (D). Asteriscos representam diferença significativa entre o tratamento e o grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA *one-way*, e *post hoc* teste de Dunnett – painéis A, B e D; $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, e *post hoc* teste de Dunn – painel C).

3.5. Análise de risco ecológico

Os estudos de análise de risco ecológico utilizando quocientes de risco são essenciais para um entendimento mais amplo e aplicado do risco que determinada substância tem em potencial para a biota aquática. A maioria dos estudos utiliza valores de MEC de ambientes temperados nos cálculos de RQ. Portanto, estudos de análise de risco voltados para ambientes tropicais, especialmente para os corpos d'água brasileiros, são extremamente relevantes.

Através dos dados da Tabela 3, podemos inferir que o Zn exerce risco ecológico para todos os níveis tróficos testados, em especial à microalga e ao microcrustáceo, onde o risco foi categorizado como alto. Segundo classificação disponível em Wee et al. (2019), valores de RQ:

menores que 0,01 constituem risco não significativo; entre 0,01 e 0,1 constituem risco baixo; entre 0,1 e 1 o risco é tido como médio; e quocientes de risco maiores que 1 são tidos como alto. Quanto à análise dos dados agudos, o risco calculado para *D. rerio* foi classificado como “Médio” (RQ = 0,60), sendo seu RQ cerca de 100 vezes menor que o RQ de *C. silvestrii* (RQ = 65,45) e 900 vezes menor que o RQ de *R. subcapitata* (RQ = 533,33). Os RQs calculados para os dados crônicos foram cerca de 50% vezes menores tanto para *R. subcapitata*, quanto para *C. silvestrii*, embora o nível de risco ainda seja classificado como “Alto”. Ressaltamos que o valor de MEC utilizado nos cálculos foi de 0,0144 mg L⁻¹ (Gebara et al., 2021), cerca de 10 vezes abaixo de 0,18 mg L⁻¹, valor máximo permitido pelo CONAMA para águas doce de classe 1 (Brasil, 2005).

Tabela 3. Análise de risco ecológico de *Danio rerio*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Raphidocelis subcapitata* expostos ao zinco (Zn) ^a.

Grupo	Espécie	Teste	Endpoint (mg L ⁻¹)	AF	PNEC (mg L ⁻¹)	RQ	Risco ^d
MA	<i>R. subcapitata</i>	A	CI50-72h = 0,027 ^b	1000	0,000027	533,33	Alto
MC	<i>C. silvestrii</i>	A	CE50-48h = 0,22 ^c	1000	0,000220	65,45	Alto
P	<i>Danio rerio</i>	A	CL50-96h = 24,18	1000	0,024180	0,60	Médio
MA	<i>R. subcapitata</i>	C	CI10-72h = 0,003269 ^b	50	0,000065	220,25	Alto
MC	<i>C. silvestrii</i>	C	CE10-7d = 0,020 ^c	50	0,000400	36,00	Alto

^a onde, MA = microalga; MC= microcrustáceo; P = peixe (embriões); A = agudo; C = crônico; RQ = quociente de risco; PNEC = concentração prevista sem efeito; MEC (concentração ambiental medida) = 0,0144 mg L⁻¹ - dados de Gebara et al., 2021; AF = *assessment factor* (fator de avaliação).

^b Dado de CI50 retirada do Capítulo 2 deste Tese.

^c Dado de CE50 de Gebara et al. (2021);

^d Segundo classificação disponível em Wee et al. (2019), valores de RQ: < 0,01 = risco não significativo; entre 0,01-0,1 = risco baixo; entre 0,1-1 = risco médio; ≥ 1 = alto.

4. Conclusões

Por meio dos dados do presente estudo, concluímos que Zn causou efeito agudo sobre a mortalidade de *zebrafish* (CL50-96 h: 24,18 mg L⁻¹) e sobre a incorporação de elementos

essenciais tais como: Ca, Na, K, Cu. O comportamento de natação foi afetado em 1,12 mg L⁻¹, concentração cerca de 10 vezes menor que a CL10-96h. Além disso, análises de risco ecológico demonstraram risco ecológico elevado de Zn sobre microalga verde e sobre cladócero tropical, e risco ecológico moderado deste metal sobre *zebrafish*.

Referências bibliográficas

- Abdel-Tawwab, M., El-Sayed, G.O., Shady, S.H., 2016. Growth, biochemical variables, and zinc bioaccumulation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) as affected by water-born zinc toxicity and exposure period. *International Aquatic Research* 8, 197-206.
- Almeida, A.R., Salimian, M., Ferro, M., Marques, P.A., Goncalves, G., Titus, E., Domingues, I., 2019. Biochemical and behavioral responses of zebrafish embryos to magnetic graphene/nickel nanocomposites. *Ecotoxicol Environ Saf* 186, 109760.
- Alsop, D., Wood, C.M., 2011. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: common mechanisms across multiple metals. *Aquat Toxicol* 105, 385-393.
- Arini, A., Gourves, P.Y., Gonzalez, P., Baudrimont, M., 2015. Metal detoxification and gene expression regulation after a Cd and Zn contamination: an experimental study on *Danio rerio*. *Chemosphere* 128, 125-133.
- Banni, M., Chouchene, L., Said, K., Kerkeni, A., Messaoudi, I., 2011. Mechanisms underlying the protective effect of zinc and selenium against cadmium-induced oxidative stress in zebrafish *Danio rerio*. *Biometals* 24, 981-992.
- Belanger, S.E., Rawlings, J.M., Carr, G.J., 2013. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ Toxicol Chem* 32, 1768-1783.
- Beppi, C., Straumann, D., Bogli, S.Y., 2021. A model-based quantification of startle reflex habituation in larval zebrafish. *Sci Rep* 11, 846.
- Boran, H., Ulutas, G., 2016. Genotoxic effects and gene expression changes in larval zebrafish after exposure to ZnCl₂ and ZnO nanoparticles. *Dis Aquat Organ* 117, 205-214.
- Brasil - Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. 2005. Resolução nº 357/2005 Brasília, DF. 36 pp.
- Brazil - Ministry of the Environment. National Environmental Council - CONAMA. 2005. Resolution n. 357/2005, March 17th. Brasília, DF. 7 pp.
- Capriello, T., Grimaldi, M.C., Cofone, R., D'Aniello, S., Ferrandino, I., 2019. Effects of aluminium and cadmium on hatching and swimming ability in developing zebrafish. *Chemosphere* 222, 243-249.

Clearwater, S.J., Farag, A.M., Meyer, J.S., 2002. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 132, 269-313.

Cooper, N.L., Bidwell, J.R., Kumar, A., 2009. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1523-1528.

Ducharme, N.A., Reif, D.M., Gustafsson, J.A., Bondesson, M., 2015. Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. *Reprod Toxicol* 55, 3-10.

EU - Europe Union. 2010. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, L 276: 233-279 pp.

Fasmina, M.F.A., Jayamanne, S.C., Liyanage, N.P.P., Perera, J.L.C.S., Silva, D.P.N., 2021. Determination of the Toxicity Cause by Trace Metals on Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo. *Journal of Aquaculture and Fish Health* 10, 176-185.

Feng, C.L., Wu, F.C., Dyer, S.D., Chang, H., Zhao, X.L., 2013. Derivation of freshwater quality criteria for zinc using interspecies correlation estimation models to protect aquatic life in China. *Chemosphere* 90, 1177-1183.

Fitzgerald, J.A., Kirla, K.T., Zinner, C.P., Vom Berg, C.M., 2019. Emergence of consistent intra-individual locomotor patterns during zebrafish development. *Sci Rep* 9, 13647.

Fitzgerald, J.A., Konemann, S., Krumpelmann, L., Zupanic, A., Vom Berg, C., 2021. Approaches to Test the Neurotoxicity of Environmental Contaminants in the Zebrafish Model: From Behavior to Molecular Mechanisms. *Environ Toxicol Chem* 40, 989-1006.

Gebara, R.C., Alho, L.O.G., Abreu, C.B., Mansano, A.S., Moreira, R.A., Rocha, G.S., Melão, M.G.G., 2021. Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). *Environ Toxicol Chem*.

Gebara, R.C., Alho, L.O.G., Rocha, G.S., Mansano, A.S., Melão, M.G.G., 2020. Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae *Raphidocelis subcapitata* at environmental concentrations. *Chemosphere* 242, 125231.

Han, E., Ho Oh, K., Park, S., Chan Rah, Y., Park, H.C., Koun, S., Choi, J., 2020. Analysis of behavioral changes in zebrafish (*Danio rerio*) larvae caused by aminoglycoside-induced damage to the lateral line and muscles. *Neurotoxicology* 78, 134-142.

Heffern, K., Tierney, K., Gallagher, E.P., 2018. Comparative effects of cadmium, zinc, arsenic and chromium on olfactory-mediated neurobehavior and gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 201, 83-90.

Hentig, J.T., Byrd-Jacobs, C.A., 2016. Exposure to Zinc Sulfate Results in Differential Effects on Olfactory Sensory Neuron Subtypes in Adult Zebrafish. *Int J Mol Sci* 17, 1-15.

Hogstrand, C., Webb, N., Wood, C.M., 1998. Covariation in regulation of affinity for branchial zinc and calcium uptake in freshwater rainbow trout. *J Exp Biol* 201, 1809-1815.

Hogstrand, C., Wilson, R.W., Polgar, D., Wood, C.M., 1994. Effects of zinc on the kinetics of branchial calcium uptake in freshwater rainbow trout during adaptation to waterborne zinc. *J Exp Biol* 186, 55-73.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assuncao, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Urun, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberlander, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nusslein-Volhard, C., Hubbard, T.J., Roest Crolius, H., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503.

Kamunde, C., MacPhail, R., 2011. Metal-metal interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ Saf* 74, 658-667.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310.

Kopp, R., Legler, J., Legradi, J., 2018. Alterations in locomotor activity of feeding zebrafish larvae as a consequence of exposure to different environmental factors. *Environ Sci Pollut Res Int* 25, 4085-4093.

Küçükoglu, M., Binokay, U.S., Boga Pekmezekmek, A., 2013. The effects of zinc chloride during early embryonic development in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Turkish Journal of Biology* 37, 158-164.

Kumar, N., Krishnani, K.K., Singh, N.P., 2020. Effect of zinc on growth performance and cellular metabolic stress of fish exposed to multiple stresses. *Fish Physiol Biochem* 46, 315-329.

Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149, 196-209.

Lu, N., Sun, S., Song, W., Jia, R., 2017. Behavioural toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to waterborne zinc and chromium (VI). *Chem Ecol* 33, 725-738.

Maage, A., Julshamn, K., Berge, G.E., 2001. Zinc gluconate and zinc sulphate as dietary zinc sources for Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition* 7, 183-187.

McRae, N.K., Gaw, S., Glover, C.N., 2016. Mechanisms of zinc toxicity in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 179, 184-190.

Naito, W., Kamo, M., Tsushima, K., Iwasaki, Y., 2010. Exposure and risk assessment of zinc in Japanese surface waters. *Sci Total Environ* 408, 4271-4284.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. 2011. Manual for the assessment of chemicals - Chapter 4: Initial assessment of data. Paris, France. 32 pp.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. 2013. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 22 pp.

Sarasamma, S., Audira, G., Juniardi, S., Sampurna, B.P., Liang, S.T., Hao, E., Lai, Y.H., Hsiao, C.D., 2018. Zinc Chloride Exposure Inhibits Brain Acetylcholine Levels, Produces Neurotoxic Signatures, and Diminishes Memory and Motor Activities in Adult Zebrafish. *Int J Mol Sci* 19.

Selderslaghs, I.W., Hooyberghs, J., De Coen, W., Witters, H.E., 2010. Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol* 32, 460-471.

Senger, M.R., Seibt, K.J., Ghisleni, G.C., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2011. Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Cell Biol Toxicol* 27, 199-205.

Sipes, N.S., Padilla, S., Knudsen, T.B., 2011. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res C Embryo Today* 93, 256-267.

Spry, D.J., Wood, C.M., 1985. Ion Flux Rates, Acid-Base Status, and Blood Gases in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*, Exposed to Toxic Zinc in Natural Soft Water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 1332-1341.

Strahle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol* 33, 128-132.

Tavares-Dias, M., 2021. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture. *Aquaculture* 535, 736350.

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment, in: Luch, A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Springer, Basel, pp. 133-164.

Velki, M., Di Paolo, C., Nelles, J., Seiler, T.B., Hollert, H., 2017. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. *Chemosphere* 180, 65-76.

Wee, S.Y., Aris, A.Z., Yusoff, F.M., Praveena, S.M., 2019. Occurrence and risk assessment of multiclass endocrine disrupting compounds in an urban tropical river and a proposed risk management and monitoring framework. *Sci. Total. Environ.* 671, 431-442.

Westerfield, M., 2000. *The Zebrafish Book. A Guide for The Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*.

Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L., 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 174-185.

Zhang, W., Fan, R., Luo, S., Ying, L., Jin, Y., Li, Y., Xiong, M., Yuan, X., Jia, L., Chen, Y., 2022. Antagonistic effects and mechanisms of carbendazim and chlorpyrifos on the neurobehavior of larval zebrafish. *Chemosphere* 293, 133522.

Zheng, J.L., Yuan, S.S., Wu, C.W., Li, W.Y., 2016. Chronic waterborne zinc and cadmium exposures induced different responses towards oxidative stress in the liver of zebrafish. *Aquat Toxicol* 177, 261-268.

Zhou, S., Chen, Q., Di Paolo, C., Shao, Y., Hollert, H., Seiler, T.B., 2019. Behavioral profile alterations in zebrafish larvae exposed to environmentally relevant concentrations of eight priority pharmaceuticals. *Sci Total Environ* 664, 89-98.

Material Suplementar

Fig. S1. Curvas de calibração dos compostos zinco (Zn)-A, sódio (Na)-B, cálcio (Ca)-C, potássio (K)-D, cobre (Cu)-E e magnésio (Mg)-F. As análises foram realizadas por meio de por meio de espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) em equipamento 8900 Triple Quadrupole ICP-MS (Agilent). Cps = *counts per second* (contagem por segundo).

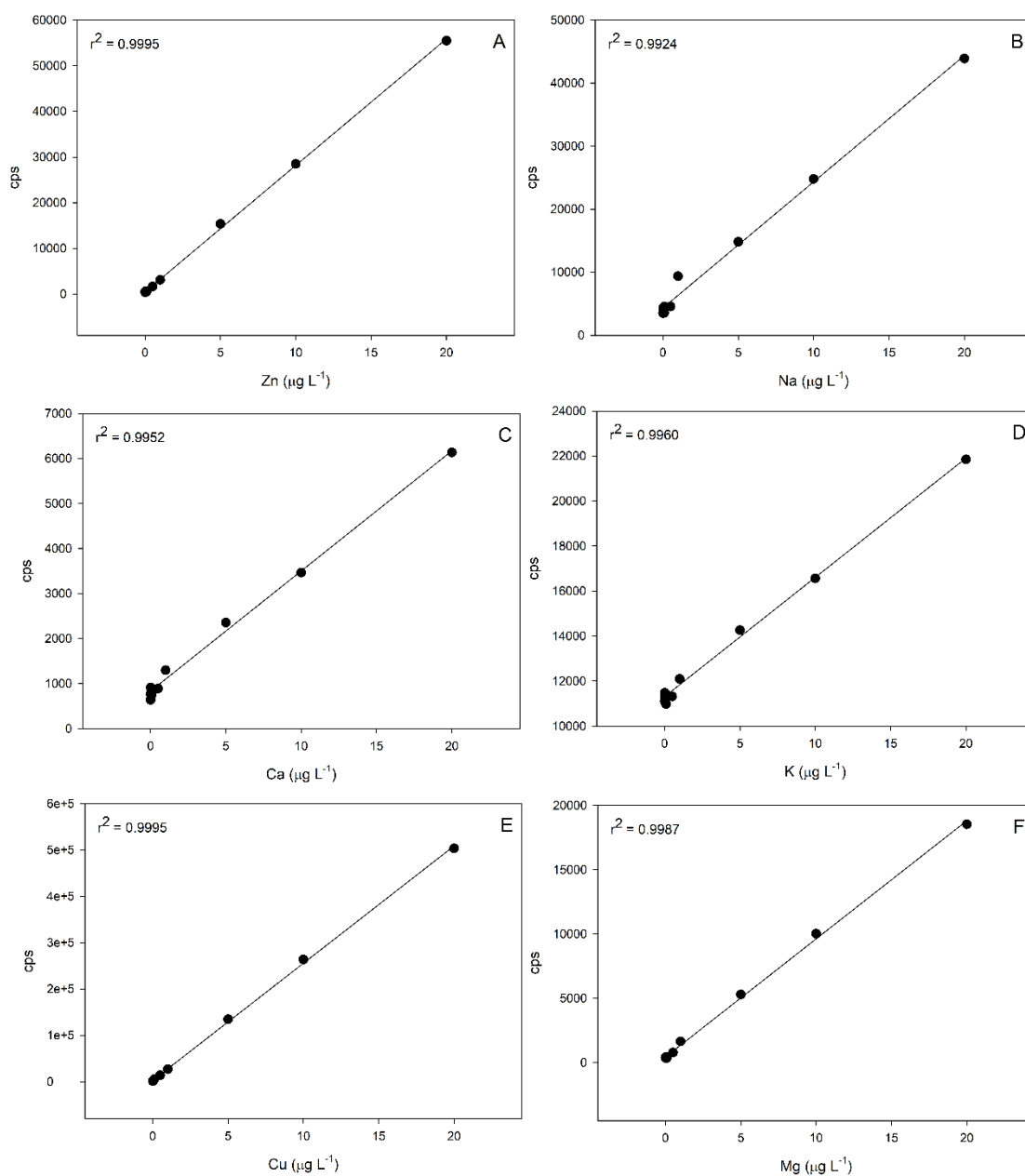
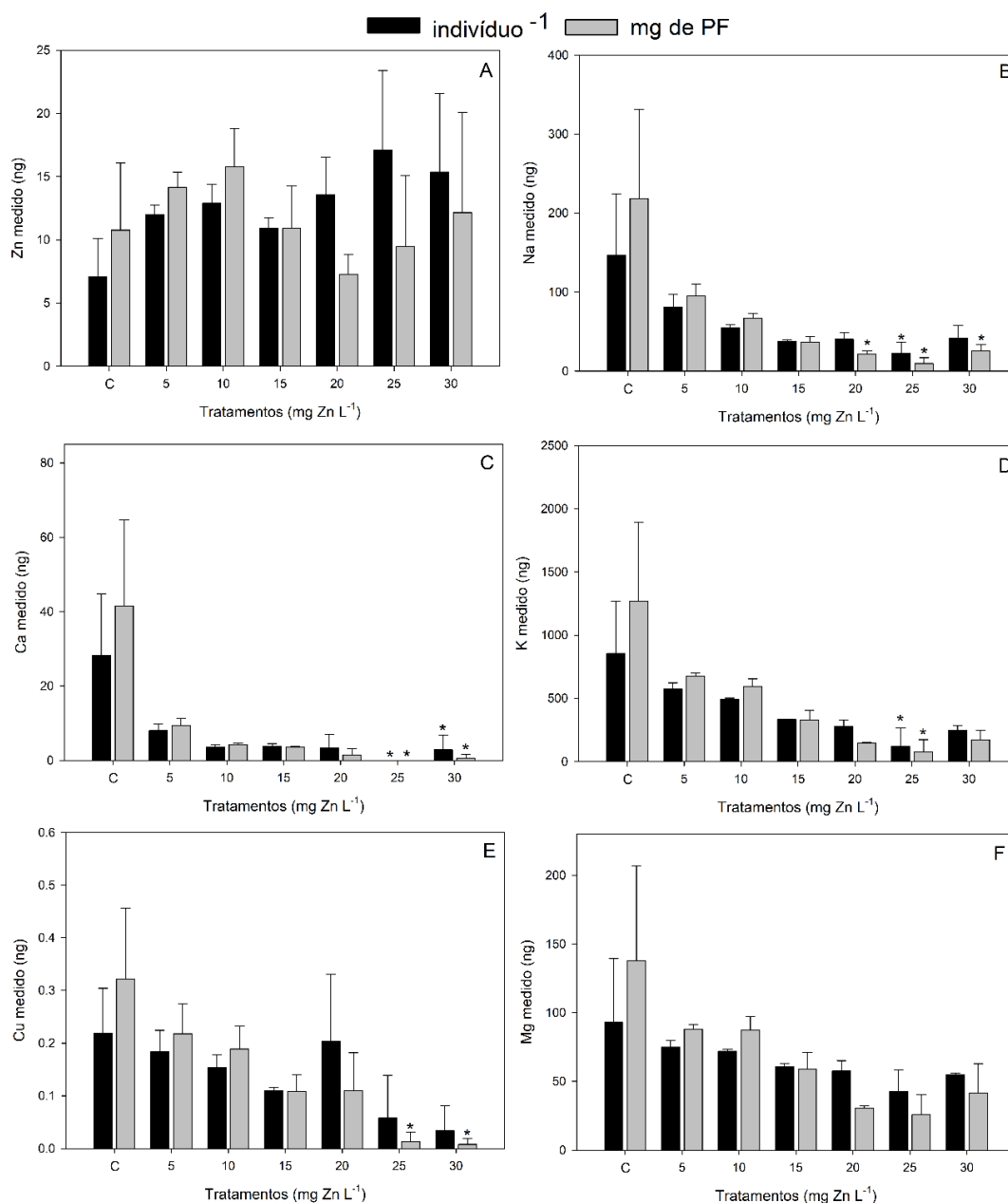


Fig. S2. Medição por ICP-MS da incorporação de zinco (Zn), sódio (Na), cálcio (Ca), potássio (K), cobre (Cu) e magnésio (Mg) por estágios iniciais de *Danio rerio*, após 120 h de exposição a concentrações de Zn. Os dados estão representados por ng Zn/indivíduo (em preto) e por ng metal/ mg peso fresco de *D. rerio* (cinza). Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA *one-way*, e *post hoc* teste de Dunnett para painéis A, B(PF), E); ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, e *post hoc* teste de Dunn para painéis B(ind.⁻¹), C, D, F).



CONCLUSÕES FINAIS

A partir do presente estudo, podemos concluir que:

- Os organismos-teste *Raphidocelis subcapitata*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Danio rerio* foram sensíveis aos metais estudados, confirmando o potencial destes organismos em ensaios ecotoxicológicos para a determinação de potencial toxicológico de metais;
- Segundo análise de modelos de equilíbrio químico, o Zn ficou mais biodisponível como íons livre do que o Al, o que explica efeitos tóxicos observados em concentrações mais baixas de Zn do que em Al, analisando-se as concentrações de metais totais adicionados;
- Segundo curva de distribuição de espécies (SSD), a microalga foi o organismo mais sensível ao zinco (Zn) e um dos mais sensíveis ao alumínio (Al);
- Segundo análise da taxa específica de crescimento de *R. subcapitata*, as misturas de Zn e Al causam efeitos sinérgicos em concentrações mais baixas e efeitos antagônicos em concentrações mais altas;
- Ao analisar misturas de Zn e Al sobre parâmetros fotossintéticos de *R. subcapitata*, observamos antagonismo em elevadas concentrações de Al;
- Zinco e Al exerceram efeito sinérgico sobre a mobilidade de *Ceriodaphnia silvestrii*;
- Análise de risco ecológico preliminar de *Ceriodaphnia silvestrii* evidenciou que as misturas de Zn e Al exercem maior risco ecológico aos corpos d'água brasileiros do que esses mesmos compostos isolados;
- O cladóceros Neotropical *Ceriodaphnia silvestrii* foi mais sensível ao Zn e Al do que espécies temperadas como, por exemplo, o microcrustáceo *Daphnia magna*. Isso reafirma a importância do uso de espécies tropicais nativas em testes ecotoxicológicos, de modo a aferir o potencial risco de contaminantes para ecossistemas aquáticos do Brasil e de outros ambientes tropicais;

- Zinco exerceu efeitos tóxicos sobre estágios iniciais de *Danio rerio*, causando letalidade em maiores concentrações, alterando a incorporação de elementos essenciais, e alterando o comportamento de natação das larvas;
- A toxicidade do Zn seguiu a seguinte ordem: microalga (*R. subcapitata*) > cladóceros (*C. silvestrii*) > zebrafish (*D. rerio* – estágios iniciais);
- A toxicidade do Al seguiu a seguinte ordem: cladóceros (*C. silvestrii*) > microalga (*R. subcapitata*).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que metais estão presentes nos ecossistemas aquáticos. Porém, eventos recentes causados por ações antropogênicas acabaram por elevar os níveis de metais em muitos corpos d'água brasileiros. Recentemente, acidentes envolvendo colapso de barragens de atividades de mineração causaram desastres ambientais imensuráveis à biodiversidade brasileira. Os metais Zn e Al ocorrem simultaneamente em corpos d'água do Brasil, porém resoluções tanto nacionais como internacionais levam em conta a toxicidade individual dos compostos. Um exemplo de legislação nacional é a Resolução CONAMA nº. 357, que dispõe sobre valores máximos permitidos para diferentes classes de águas. Portanto, estudos que avaliem a toxicidade de compostos em mistura são essenciais.

Para o estudo desta Tese, escolhemos organismos-teste padronizados em Ecotoxicologia: a microalga cosmopolita *Raphidocelis subcapitata*, o cladócero Neotropical *C. silvestrii*, e estágios iniciais do peixe *Danio rerio*. É importante ressaltar que selecionamos uma espécie de cladócero nativa do Brasil, uma vez que espécies temperadas não são representativas para ambientes tropicais e podem acabar subestimando o potencial tóxico de contaminantes em análises de risco para corpos d'água brasileiros.

Em relação à 1ª hipótese, ela foi corroborada, visto que ambos os metais Zn e Al causaram efeitos deletérios a todos os organismos-teste estudados.

Com relação à 2ª hipótese, com base na literatura esperávamos diferentes especiações de Zn e Al nas soluções-teste; essa hipótese foi corroborada, visto que nos diferentes meios de cultivo (*half-strength* CHU-10 (meio algal), ASTM (meio do microcrustáceo) e OECD *water* (meio do peixe), as soluções-teste apresentaram altos níveis de Zn^{2+} e baixos níveis de Al^{3+} . A diferença na especiação provavelmente levou a diferentes biodisponibilidades dos metais, possivelmente explicando toxicidade do Zn em concentrações menores do que as de Al.

No que se refere à 3ª hipótese, os efeitos das misturas não foram simplesmente aditivos. Em misturas de Zn e Al, em baixas concentrações observamos efeitos sinérgicos sobre crescimento de *R. subcapitata* e sobre mobilidade de *C. silvestrii*; enquanto que em altas concentrações observou-se antagonismo sobre crescimento e parâmetros fotossintéticos de *R. subcapitata*.

Com relação à 4ª hipótese, os organismos foram sensíveis aos metais, de modo que para o Zn, *R. subcapitata* foi o organismo mais sensível; enquanto que para o Al, *C. silvestrii*

foi mais sensível.

A 5ª hipótese foi corroborada, visto que, segundo análise de risco com *C. silvestrii*, misturas de Zn e Al possuem maior fator de risco ecológico do que os metais isolados.

Sabemos que a biota aquática é exposta aos contaminantes via água e via alimento contaminado. Portanto, para estudos futuros, sugerimos estudos que avaliem misturas de Zn e Al sobre uma cadeia trófica, investigando o possível efeito do alimento contaminado sobre consumidores primários e secundários. Acreditamos também que estudos acerca de misturas de Zn e Al em temperaturas elevadas, simulando cenários de aquecimento global são de extrema importância, haja vista o cenário global atual.