



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



LAYS DE OLIVEIRA GONÇALVES ALHO

**Efeitos de um metal essencial (Mn) e um não essencial (Cr), isolados e em mistura, na
clorofícea de água doce *Raphidocelis subcapitata***

São Carlos

2022

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

LAYS DE OLIVEIRA GONÇALVES ALHO

**Efeitos de um metal essencial (Mn) e um não essencial (Cr), isolados e em mistura, na
clorofícea de água doce *Raphidocelis subcapitata***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão

Co-orientadora: Dra. Giseli Swerts Rocha

São Carlos

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 da candidata Lays de Oliveira Gonçalves Alho, realizada em 10/01/2022.

Comissão Julgadora:

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

Profa. Dra. Odete Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCar)

Profa. Dra. Renata Fracácio (UNESP)

Profa. Dra. Suzelei Rodgher (UNESP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

Este trabalho é dedicado ao meu Pai Supremo e Soberano, à minha família (Léo e João Lucas), pais, irmãs e irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir essa experiência e estar comigo ao longo do percurso, ensinando e moldando minha vida, proporcionando alegrias através dos amigos com os quais me presenteou e dando suporte à minha família.

À minha família, Leonardo e João Lucas, pelo amor, cuidado, paciência e carinho ao longo de todo o percurso. Gratidão eterna por vocês e o pelo que representam para mim.

Aos meus pais, Cleber e Lília, minhas irmãs e cunhados (Naara, Aréli, Everton e Lucas), pela paciência e orações ao longo do trabalho. Pelos conselhos e carinho dedicados ao longo da minha vida e pelos ensinamentos que marcaram meu coração.

À minha avó Nézia, que hoje vive ao lado do Eterno, pelo tempo e carinho dedicados enquanto eu estava realizando minha formação. Pelas preocupações e afeto demonstrados nos gestos mais singelos. Sou grata por cada minuto.

Aos meus sogros Silena e Paschoal, e aos meus saudosos avós Odila e Faustino, pelo carinho, cuidado e incentivo.

Aos meus avós Lourival e Necy, e minha avó Joana, pelas preocupações e orações durante todo o processo. Agradeço o carinho de cada um.

Aos meus amigos Muriel, Giuliane, Marri, Leon e aos amigos da SER pelo incentivo e orações

Aos amigos do laboratório Renan, Cínthia, Lucas, Larissa e Karime e ao técnico Fábio pela ajuda, apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão pela orientação e aprendizado que me proporcionou no decorrer do trabalho. Agradeço pela paciência, oportunidade e amizade.

À Dra. Giseli Swerts Rocha pela orientação, ajuda e amizade ao longo do trabalho. Obrigada pela disponibilidade, paciência e conhecimento passado.

À Dra. Adrislaine da Silva Mansano pela grande ajuda, orientação, carinho e amizade ao longo deste trabalho. Obrigada pela paciência e pelo conhecimento passado.

À Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi pela disponibilidade, gentileza e apoio ao longo do trabalho.

À Profa. Dra. Odete Rocha pela disponibilidade, ensinamentos e apoio ao longo do trabalho.

À banca examinadora, pelas sugestões e considerações que contribuíram para melhorar substancialmente a qualidade deste trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos por ter sido minha casa por tantos anos e por toda a formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais por me proporcionar conhecimento, aprendizado e contribuir substancialmente com minha formação acadêmica.

Ao CNPQ, pela bolsa concedida

A todos, meu mais sincero agradecimento.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Taxa relativa de crescimento (média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* após 72 hrs de exposição ao manganês (A) e ao cromo (B). As concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferenças significativas quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). 29

Figura 2: Fluorescência celular média da Clo *a* (FL3-H relativo) (média \pm DP), complexidade celular (SSC-H relativo) (média \pm DP) e tamanho celular relativo (FSC-H relativo) (média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 72 hrs de exposição ao manganês (A, C, E) e ao cromo (B, D, F). As concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferença significativa dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$). 32

Figura 3: Fig. 3: Espécies reativas de oxigênio (ROS) (média \pm DP) produzidas por *Raphidocelis subcapitata* entre 0 a 72 hrs de exposição ao manganês (A) e ao cromo (B). As concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferenças significativas quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). 34

Figura 4: Distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) baseada em valores de EC/IC/LC₅₀ (mg metal L⁻¹) de organismos de água doce expostos ao manganês (A) e ao cromo (B). Os dados foram obtidos da literatura (Tabelas S2 e S3, material suplementar) e os resultados para a *Raphidocelis subcapitata* (presente estudo) estão apresentados em negrito. 36

Figura 5: Isoblograma dos efeitos das misturas dos metais na taxa relativa de crescimento da microalga *Raphidocelis subcapitata*, seguindo o modelo de referência de Ação Independente. Linhas lineares indicam ausência de interação, formas côncavas demonstram sinergismo e formas convexas representam antagonismos (Alloatti et al., 2013). 40

CAPÍTULO 2

Figura 1: Curvas de crescimento (média \pm DP) de *Raphidocelis subcapitata* ($\times 10^4$ células mL⁻¹) expostas ao manganês (A) e ao cromo (B) durante 72 hrs, e densidade celular das algas ($\times 10^4$ células mL⁻¹) após 72 hrs de exposição a misturas binária dos metais (C). O grupo controle (0,009 μ M de Mn) está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferenças significativas em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$).

78

Figura 2: Rendimento quântico máximo (Φ_M) (A, B, C; média \pm DP) e a eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_V) (D, E, F; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao manganês (A, D) e ao cromo (B,E) durante 72 hrs, e à mistura binária dos metais (C, F) após 72 hrs de exposição. O grupo controle (0,009 μ M de Mn) está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferenças significativas em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$).

80

Figura 3: Rendimento quântico efetivo (Φ'_M) (A, B, C; média \pm DP) e parâmetros de decaimento (decaimento fotoquímico – qP e decaimentos não-fotoquímicos – qN e NPQ) (D, E, F; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao manganês (A,D) e ao cromo (B,E) ao longo de 72 hrs, e à mistura binária dos metais (C, F) após 72 hrs de exposição. O grupo controle está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferença significativa dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

83

Figura 4: Fluorescência da clorofila *a* (FL3-H relativo) (A, B, C; média \pm DP) e espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species* - ROS) (D, E, F; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao manganês (A,D) e ao cromo (B,E), e à mistura binária dos metais (C, F) após 72 hrs de exposição. O grupo controle está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferença significativa dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

86

CAPÍTULO 3

Figura 1: Curvas de crescimento (média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* ($\times 10^4$ cels mL⁻¹) exposta ao manganês (A) e ao cromo (B) a longo de 72 hrs, e densidade de células ($\times 10^4$ cels mL⁻¹) após 72 hrs de exposição à mistura binária dos metais (C). O grupo controle está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferença significativa dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

113

Figura 2: Tamanho celular relativo (FSC-H relativo) (A, B, C; média \pm DP) e espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species* - ROS) (D, E, F; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição ao manganês (A,D) e ao cromo (B,E) e à mistura binária dos metais (C, F). Tratamentos M1 a M16 se referem às soluções-teste com a mistura de Mn e Cr; C = grupo controle. As concentrações dos metais estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferenças significativas dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

115

Figura 3: Medidas de carboidratos totais (A, B, C; média \pm DP) e lipídios totais (D, E, F; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* após 96 hrs de exposição ao manganês (A,D) e ao cromo (B,E) e à mistura binária dos metais (C, F). Tratamentos M1 à M16 se referem às soluções-teste com a mistura de Mn e Cr; C = grupo controle. As concentrações dos metais estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferenças significativas dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

118

Figura 4: Composição de classes lipídicas individuais (pg cell⁻¹) (A to G) e em porcentagem de lipídios totais (H) da microalga *Rahpidocelis subcapitata* após 96 hrs de exposição ao Mn na forma isolada. As classes lipídicas são HC (A – hidrocarbonetos alifáticos), KET (B – cetona), TAG (C – triacilgliceróis), FFA (D – ácidos graxos livres), ST (E – ácidos graxos livres), AMPL (F – lipídios polares móveis em acetona) and PL (G – fosfolipídios). ND significa não detectado. As concentrações de Mn estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferenças significativas dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

123

Figura 5: Composição de classes lipídicas individuais (pg cell⁻¹) (A to G) e em

124

porcentagem de lipídios totais (H) da microalga *Rahpidocelis subcapitata* após 96 hrs de exposição ao Cr na forma isolada. As classes lipídicas são HC (A – hidrocarbonetos alifáticos), KET (B – cetona), TAG (C – triacilgliceróis), FFA (D – ácidos graxos livres), ST (E – ácidos graxos livres), AMPL (F – lipídios polares móveis em acetona) and PL (G – fosfolipídios). ND significa não detectado. As concentrações de Cr estão expressas em μM . O símbolo * representa diferenças significativas dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Resumo dos parâmetros e testes de ajuste do modelo de referência Ação Independente, aplicado às taxas relativas de crescimento da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta a mistura de manganês (Mn) e cromo (Cr) por 72 hrs. 39

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Concentração de inibição ($IC_{50-72hrs}$; valores \pm DP), concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO) para *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Mn e ao Cr. Os valores foram calculados com base na densidade celular (células mL^{-1}) da microalga. 76

Tabela 2: Valores de rendimento quântico máximo (Φ_M ; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à mistura de manganês (Mn) e cromo (Cr). Somente os resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$, One-Way ANOVA) em comparação com o controle ou com os metais isolados estão apresentados abaixo. Interações sinérgicas (S) foram assumidas quando os efeitos observados foram menores que os efeitos preditos, e interações antagônicas (A) foram assumidas quando os efeitos observados foram maiores que os efeitos preditos. 88

Tabela 3: Valores de eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_V ; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à mistura de manganês (Mn) e cromo (Cr). Somente os resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$, One-Way ANOVA) em comparação com o controle ou com os metais isolados estão apresentados abaixo. Interações sinérgicas (S) foram assumidas quando os efeitos observados foram menores que os efeitos preditos, e interações antagônicas (A) foram assumidas quando os efeitos observados foram maiores que os efeitos preditos. 89

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Valores de carboidratos totais e lipídios totais (pg cel^{-1} ; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à mistura de manganês (Mn) e cromo (Cr). Somente os resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$, One-Way ANOVA) em comparação com o controle ou com os metais isolados estão apresentados abaixo. Interações sinérgicas (S) foram assumidas quando os efeitos observados foram menores que os efeitos preditos, e interações antagônicas (A) foram assumidas quando os efeitos observados foram maiores que os efeitos preditos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Φ_M = rendimento quântico máximo do fotossistema II

Φ_M' = rendimento quântico efetivo do fotossistema II

ALC = álcool alifático livre

AMPL = lipídios polares móveis em acetona

ANOVA = análise de variância

ATP = adenosina trifosfato

CCL = complexo coletor de luz do fotossistema II

CEO = complexo de evolução do oxigênio

Cel = célula

Chl *a* = clorofila *a*

FFA = ácidos graxos livres

F_M = fluorescência máxima de algas adaptadas ao escuro

F'_M = fluorescência máxima de algas adaptadas à luz

F₀ = fluorescência mínima de algas adaptadas ao escuro

F'₀ = fluorescência mínima de algas adaptadas à luz

F₀/F_v = eficiência do complexo de evolução do oxigênio

F_v/F_m = rendimento quântico máximo do fotossistema II

F'_v/F'_m = rendimento quântico efetivo do fotossistema II

HC = hidrocarbonetos

IC₅₀ = Concentração de inibição média

KET = ketone (cetona)

NPQ = coeficiente de dissipação não fotoquímica

PAM = pulso de amplitude modulada

PL = fosfolipídios

PSI = fotossistema I

PSII = fotossistema II

Q_A = quinona A

qN = coeficiente de dissipação não fotoquímica

qP = coeficiente de dissipação fotoquímica

ROS = espécies reativas de oxigênio

ST = esterol

TAG = triglicerídeos

WE = éster de cera

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Ecotoxicologia aquática e contaminação por metais	3
1.2. Manganês	4
1.3. Cromo	5
1.4. Misturas de metais e a ecotoxicologia	7
1.5. Algas na Ecotoxicologia – Foco em contaminação por metais	8
1.6. Estruturação da Tese	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Cultivo da microalga em condições controladas de laboratório	15
3.2. Testes Ecotoxicológicos com a microalga	15
3.3. Densidade celular e medidas de espécies reativas de oxigênio	16
3.4. Atividade fotossintética da alga	17
3.5. Compostos de reserva de energia	18
3.6. Determinação da concentração de metal	19
3.7. Análise dos dados	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. CAPÍTULO 1: Efeitos individuais e combinados de manganês e cromo em uma clorófitica de água doce	20

Resumo	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1. Cultivo das algas	24
2.2. Testes de toxicidade dos metais isolados e das misturas	24
2.3. Análises citométricas	25
2.4. Determinação da concentração de metal	25
2.5. Análise dos dados	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1. Validação dos testes	28
3.2. Toxicidade dos metais isolados	28
3.3. Análise das curvas SSD	35
3.4. Toxicidade dos metais combinados	37
4. CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	43
MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 1	50
4.2. CAPÍTULO 2: Impactos da mistura binária de manganês e cromo na fotossíntese de uma microalga de água doce	69
Resumo	69
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAIS E MÉTODOS	73
2.1. Cultivo algal e testes de toxicidade	73
2.2. Determinação do metal	73
2.3. Análises citométricas	74

2.4. Parâmetros fotossintéticos	74
2.5. Análises estatísticas	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4. CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91
MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 2	95
4.3. CAPÍTULO 3: Efeitos do manganês e cromo, em exposição individual e em mistura, nos compostos de reserva de energia da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i>	104
Resumo	104
3. INTRODUÇÃO	106
4. MATERIAIS E MÉTODOS	107
2.1. Cultivo algal e testes de toxicidade	108
2.2. Determinação dos metais	108
2.3. Análises no citômetro de fluxo	109
2.4. Quantificação dos compostos de reserva de energia	109
2.4.1. Carboidratos totais	109
2.4.2. Lipídios totais e composição de classes lipídicas	110
2.5. Análises estatísticas	110
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
4. CONCLUSÃO	125
5. REFERÊNCIAS	126
MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 3	132
5. CONCLUSÕES	136
6. REFERÊNCIAS	139

RESUMO

A contaminação de ecossistemas aquáticos por metais representa riscos para a biota aquática. Frequentemente, os metais não estão presentes nos ambientes de maneira isolada, de forma que os organismos aquáticos são expostos a vários compostos químicos simultaneamente. Apesar disso, ainda não existem muitos dados sobre os efeitos a longo prazo de mistura de metais nos organismos aquáticos. Este trabalho visou investigar os efeitos tóxicos um metal essencial, manganês (Mn), e um não essencial, cromo (Cr), de forma isolada e em mistura, na clorofícea de água doce *Raphidocelis subcapitata*. Este trabalho avaliou o impacto dos metais isolados e combinados no crescimento, na atividade fotossintética, composição bioquímica e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) dessa clorofícea, de forma a se obter uma avaliação aprofundada das ações tóxicas dos contaminantes. Tanto o Mn quanto o Cr levaram à inibição do crescimento e da fluorescência da clorofila *a* da microalga, sendo o Mn mais tóxico que o Cr. A curva de distribuição de sensibilidade de espécies revelou que a espécie utilizada no presente estudo foi a mais sensível ao Mn, dentre vários organismos de água doce expostos a esse metal. O Mn afetou negativamente a eficiência do complexo de evolução do oxigênio, o rendimento efetivo e quenching fotoquímico da microalga, enquanto o Cr levou a alterações menos severas nessas variáveis, provavelmente devido à ativação de mecanismos de fotoproteção. A mistura de Mn e Cr apresentou efeitos aditivos para a microalga, sendo o modelo de referência de Ação Independente (AI) o que melhor se ajustou aos dados. A produção ROS aumentou significativamente após 96 horas de exposição aos metais. Nas concentrações mais altas de Mn (7,28 e 14,56 μM), nas quais houve maior produção de lipídios em resposta ao metal, os níveis intracelulares de ROS caíram, o que sugere o aumento de lipídios como um mecanismo de defesa. A combinação dos metais levou a efeitos sinérgicos para o rendimento efetivo da alga e antagônicos para a concentração de carboidratos totais. Mn e Cr levaram à respostas diferentes da microalga em relação à composição das classes lipídicas: o Mn causou aumento dos níveis de hidrocarbonetos (HC), cetona (KET), ácidos graxos livres (FFA), esterol (ST) e lipídios polares móveis em acetona (AMPL), enquanto a exposição ao Cr induziu a redução de triacilgliceróis (TAG), ST e AMPL. Os dados deste estudo contribuem com informações sobre os riscos potenciais de toxicidade do Mn e do Cr, isolados e em mistura, em ecossistemas de água doce.

Palavras-chave: Mistura de metais, Ecotoxicologia, *Raphidocelis subcapitata*, Espécies planctônicas.

ABSTRACT

Metal contamination of aquatic ecosystems poses to aquatic biota. Usually, metals are not present isolated in environments, so aquatic organisms are exposed to several chemical compounds simultaneously. Despite this, there is still not much data on the long-term effects of metal mixtures on aquatic organisms. This study investigates the toxic effects of an essential metal, manganese (Mn), and a non-essential one, chromium (Cr), in single and combined form, on the freshwater chlorophyte *Raphidocelis subcapitata*. This research evaluated the impact of the metals in isolated and mixture forms on growth, the photosynthetic activity, biochemical composition, and reactive oxygen species (ROS) production of this chlorophyte to obtain an in-depth assessment of the toxic actions of the contaminants. Both Mn and Cr led to growth inhibition and reduced the chlorophyll *a* fluorescence of the microalgae, being Mn more toxic than Cr. The species sensitivity distribution curve revealed that the species used in the present study was the most sensitive to Mn, among other several freshwater organisms exposed to this metal. Mn negatively affected the efficiency of the oxygen evolution complex, the effective quantum yield, and photochemical quenching of the microalgae. At the same time, Cr led to less severe alterations in these parameters, probably due to the activation of photoprotection mechanisms. The mixture of Mn and Cr showed additive effects for the microalgae, and the Independent Action reference model was the one that best fitted the data. The ROS production increased significantly after 96 h of exposure to both metals. At high Mn concentrations (7.28 and 14.56 μM), in which there was more outstanding production of lipids in response to the stress caused by the metal, the intracellular levels of ROS dropped, suggesting that the increase in the total lipids content acted as a defense. The combination of the metals led to synergistic effects for the effective quantum yield and antagonistic for the total carbohydrates content of the alga, highlighting the importance of studies that consider metal interactions in ecotoxicological assessments. Mn and Cr led to different microalgae responses regarding the lipid class composition: Mn caused an increase in the levels of aliphatic hydrocarbons (HC), ketone (KET), free fatty acids (FFA), free sterol (ST), and acetone-mobile polar lipids (AMPL), while Cr induced a reduction in triglycerides (TAG), ST and AMPL. The data from this study contribute with information on the potential risks of Mn and Cr toxicity, isolated and combined, in freshwater ecosystems.

Keywords: Metal mixtures; Ecotoxicology; *Raphidocelis subcapitata*; Planktonic species.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ecotoxicologia aquática e contaminação por metais

Todos os setores de nossa sociedade geram resíduos: indústria, agricultura, mineração, energia, transporte, construção; assim como nós, os consumidores. A poluição pode ser causada por esses resíduos quando eles são liberados além da capacidade de assimilação do meio ambiente (Belay, 2010). A Ecotoxicologia consiste em uma ótima ferramenta para produzir informações que vão gerar subsídios e condições de manejo para proteção da biota, uma vez que se trata de uma área especializada da Toxicologia Ambiental que estuda os efeitos causados por agentes químicos sobre a dinâmica de populações e de comunidades integrantes dos ecossistemas (Ronco et al., 2004). Várias diretrizes de proteção ambiental dependem de dados ecotoxicológicos para a avaliação e gestão de contaminantes químicos (Expósito et al., 2017).

A contaminação de sistemas aquáticos tem aumentando globalmente e representa uma das preocupações ambientais mais críticas (Shaw et al., 2005). Nesse sentido, a ecotoxicologia aquática tem como principal objetivo a avaliação e proteção dos ecossistemas aquáticos. Esse objetivo é alcançado, em parte, através de processos de análises de risco e formulação de diretrizes para classificar a qualidade da água de ambientes aquáticos, de forma a fornecer proteção à integridade do ecossistema e à biodiversidade. Para a formulação de diretrizes apropriadas, se faz necessário o desenvolvimento de testes de toxicidade que utilizem organismos-teste sensíveis e representativos das espécies que ocorrem naturalmente nos ecossistemas, a fim de se obter o máximo de proteção das mesmas (Echols et al., 2010). Na ecotoxicologia aquática, normalmente os organismos testados pertencem a três níveis tróficos básicos: produtores primários (na parte inferior da cadeia trófica), produtores secundários (o elo intermediário) e consumidores (nível trófico superior). Dependendo da concentração do composto e do tempo de exposição, os testes são capazes de avaliar a toxicidade crônica ou aguda (Expósito et al., 2017).

Dentre a grande variedade de poluentes ambientais encontrados na natureza, que interferem no metabolismo de organismos fotossintetizantes, os metais são os mais comuns e geralmente estão presentes em concentrações que afetam a biota ali presente

(Mallick & Mohn, 2003; Perales-Vela et al., 2010). Esses poluentes químicos produzem efeitos agudos e crônicos na biota aquática, afetando o crescimento, a reprodução e o desenvolvimento desses organismos (Martínez-Ruiz & Martínez-Jerónimo, 2015). Uma vez que os compostos metálicos são amplamente utilizados nas indústrias e na agricultura, os níveis desses compostos nos ecossistemas tem aumentando substancialmente no mundo desde o último século. Os ambientes aquáticos, particularmente, são muito suscetíveis à acumulação de diferentes metais, e levando em conta que os compostos metálicos não são degradáveis, esses contaminantes podem exercer efeitos tóxicos para várias espécies aquáticas via exposição corporal ou através de transferência pela cadeia alimentar (Hook & Fisher, 2001; Rocha et al., 2016).

1.2. Manganês

O manganês (Mn) é um elemento ubíquo que ocorre em todo mundo, essencial para plantas e animais. É utilizado na produção de aço, baterias e fósforos, além de ser um ingrediente na produção de gasolina, cerâmica, esmaltes, pesticidas e fertilizantes. Esse metal é um componente comum em descargas de atividades de mineração, operações de fundição e outras atividades industriais. Em águas de superfície aeróbicas com pH acima de 7, as concentrações de Mn dissolvido são baixas devido às reações de equilíbrio que favorecem a conversão ao Mn(IV), que por sua vez é sequestrado em óxidos de Mn insolúveis (Lasier et al., 2000). O manganês apresenta um papel importante na oxidação da água na fotossíntese, mas apesar de ser um metal essencial, requerido para o crescimento normal das células e ativamente absorvido por células vegetais, quando presente em concentrações acima dos limites de tolerância do organismo avaliado, se torna tóxico e mutagênico (Singh & Kashyap, 1978; Sunda & Huntsman, 1985).

Segundo o DNPM (2015) (Departamento Nacional de Produção Mineral), a reserva mundial de manganês em 2014 foi estimada em 625 Mt de minério bruto, sendo que 116 Mt de reserva (18,3%) se encontrava no Brasil. Em 2015 a produção bruta de Mn no Brasil foi de 4 402 273 t (DNPM, 2016). Apesar da alta produção, esse elemento é frequentemente esquecido em se tratando de análise da toxicidade de efluentes e sedimentos (Lasier et al., 2000). Águas hipolimnéticas liberadas de reservatórios, drenagens de minas e até lixiviação de solos contendo altas concentrações de manganês,

podem atingir ecossistemas aquáticos e afetar a sobrevivência e crescimento de organismos aquáticos. Cátions divalentes de manganês, a forma mais tóxica do metal, tem demonstrado efeitos mutagênicos em bactérias, bacteriófagos, leveduras e cianobactérias, uma vez que reduz a eficiência da DNA polimerase na seleção de bases nucleotídicas (Singh & Kashyap, 1978).

Existem poucas pesquisas relacionadas à toxicidade do Mn aos organismos aquáticos mais utilizados em testes ecotoxicológicos (Sunda & Huntsman, 1985), sendo que a maioria desses estudos tem foco em espécies de peixes expostas às águas hipolimnéticas liberadas de reservatórios. Porém, organismos fitoplanctônicos e zooplanctônicos geralmente apresentam maior sensibilidade aos contaminantes ambientais, como Mn, e alterações causadas por metais tóxicos podem ser transmitidas ao longo da cadeia trófica para seus consumidores (Peters et al., 2011).

Tanto os testes de toxicidade agudos quanto os crônicos variam entre as espécies testadas, e tem sido demonstrado que eles dependem fortemente das condições da água (Massarin et al., 2010). Concentrações elevadas de Mn foram tóxicas para os organismos-modelo *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia* e *Pimephales promelas*, e *C. dubia* e *Hyalella azteca*, como relatado por Peters et al. (2011). e Lasier et al. (2000), respectivamente.

1.3. Cromo

O cromo é um dos poluentes metálicos mais comuns e persistentes no ambiente, uma vez que entra no ambiente aquático através de efluentes de indústrias, tais como indústrias têxteis, de curtume, mineração, galvanoplastia, tingimento, impressão, produtos farmacêuticos, fabricação de aço inoxidável e fabricação de borracha (Bakshi & Panigrahi, 2018). O cromo é o sétimo metal mais abundante na crosta terrestre (Rodríguez et al., 2007), com peso atômico de 51,996, na forma cristalina, é um metal duro cinzento, lustroso, de número atômico 24, uma densidade de 7,14, um ponto de fusão de 1900 °C e um ponto de ebulição de 2642 °C . Naturalmente, quatro isótopos de cromo são encontrados: Cr-50 (4,3%), Cr-52 (83,8%), Cr-53 (9,6%) e Cr-54 (2,4%), e outros sete são de origem antropogênica (Bakshi & Panigrahi, 2018).

O cromo pode existir nas formas divalente (Cr^{2+}), trivalente (Cr^{3+}), e hexavalente (Cr^{6+}), sendo Cr^{3+} e Cr^{6+} as formas mais predominantes e estáveis (Rodríguez et al, 2007). O cromo trivalente tem sido reportado como essencial para mamíferos, uma vez que possui um papel efetivo nos metabolismos da glicose, lipídios e proteínas (Bakshi & Panigrahi, 2018). Essa forma do cromo é conhecida por apresentar uma baixa permeabilidade de membrana e baixa tendência de se biomagnificar na cadeia alimentar (Bakshi & Panigrahi, 2018), de maneira que sua toxicidade geralmente é mais baixa em comparação à forma hexavalente. Mas apesar da estabilidade termodinâmica do Cr(III), a presença de certos minerais que ocorrem naturalmente, especialmente óxidos de MnO_2 , pode favorecer a oxidação do Cr(III) a Cr(VI) no solo. Este fator é de interesse público porque em pH alto, o Cr(VI) se torna biodisponível. Esta forma do Cr é altamente móvel e, portanto, representa o maior risco de contaminação das águas subterrâneas (Belay, 2010). A cromita ($[\text{Fe}, \text{Mg}] \text{Cr}_2\text{O}_4$) é o mineral mais comum contendo Cr(III), enquanto o mineral raro crocoíta (PbCrO_4) é praticamente a única fonte natural de Cr(VI) na terra (Vaiopoulou & Gikas, 2020).

O cromo hexavalente é a forma mais tóxica desse metal devido à sua alta permeabilidade através da membrana celular, alta solubilidade e mobilidade no meio aquático (Bakshi & Panigrahi, 2018; Rodríguez et al., 2007). A alta toxicidade do Cr^{6+} já foi reportada para protozoários (Madoni et al., 1996), cianobactérias (Rodgher et al., 2012), algas (Rosícková-Padrtoová e Marsáler, 1999), mexilhão (Keller & Zam, 1991), crustáceos (Martínez-Jerónimo, 2006) e peixes (Sanyal et al., 2017), devido ao seu elevado potencial de oxidação e capacidade de atravessar membranas biológicas, como já mencionado anteriormente. Os mecanismos de entrada do Cr^{3+} nas células ainda não são bem compreendidos (Aharchaou et al., 2017).

O cromo tri e hexavalente são considerados poluentes prioritários pela USEPA e vários critérios de qualidade da água tem sido sugeridos, dependendo da especiação do cromo, do receptor aquático ou consumo humano e efeitos de toxicidade (USEPA, 2009; 2012). Os padrões brasileiros para lançamento de efluente apresentam como valores máximos 1.92 μM para Cr(VI) e de 19.2 μM para Cr(III), para descarte direto em corpos d'água sem especificação do tipo de corpo d'água receptor (CONAMA - MMA, 2011). Em água doce não poluída, as concentrações de Cr podem variar de 1 a 10 μM ; entretanto, em águas poluídas, os níveis podem chegar a 1,5 e 48 mM, como os valores relatados para efluentes de fábricas de papel e efluentes de curtume,

respectivamente (Cervantes et al., 2001; Rodríguez et al., 2007). De acordo com Sánchez-Fortún et al. (2009), efluentes não tratados de descargas industriais contêm aproximadamente 1,53 - 1,92 mM desse metal. Efluentes de curtume são classificados como os mais poluentes entre todos os resíduos industriais. Eles são os principais contribuidores da poluição por cromo (Belay, 2010).

1.4. Misturas de metais e a ecotoxicologia

Muitos ambientes aquáticos são contaminados com misturas contendo múltiplos metais. Como consequência, os organismos aquáticos são frequentemente expostos a vários compostos químicos simultaneamente no ambiente natural. Esses contaminantes têm efeitos complexos nos organismos, que podem ser aditivos, antagônicos ou sinérgicos (Hanazato, 2001). Para explicar o comportamento das misturas químicas, vários modelos teóricos foram desenvolvidos, e são baseados em dois modelos de referência (Loureiro et al., 2010): adição de concentração (AC) (Loewe & Muischnek, 1926) e ação independente (AI) (Bliss, 1939). Esses modelos assumem que não ocorre nenhuma interação entre os produtos químicos e são usados para descrever a toxicidade combinada com base no modo de ação (MoA) de cada produto químico em sua forma isolada. AC assume que os compostos possuem o mesmo MoA, agindo sobre o mesmo alvo biológico, contribuindo para uma resposta comum proporcional às suas respectivas toxicidades individuais (Loureiro et al., 2010; Mansano et al., 2017). O modelo AI assume que os produtos químicos possuem diferentes MoA e, portanto, seus efeitos são independentes entre si, sendo os efeitos combinados calculados pela multiplicação das probabilidades de respostas (Loureiro et al., 2010; Mansano et al., 2017). Quando o MoA dos produtos químicos é desconhecido ou não está bem estabelecido, os modelos AC e AI são usados para descrever os dados, e aquele que melhor se ajustar aos dados é escolhido em detrimento do outro (Mansano et al., 2017; Pavlaki et al., 2011). Em relação aos metais, os mecanismos de toxicidade são complexos e ainda não totalmente compreendidos (Nys et al., 2018), pois os efeitos da toxicidade são sempre específicos do organismo e/ou específico do metal e, portanto, a melhor opção é a aplicação dos dois modelos de referência AC e AI ao investigar a toxicidade de metais combinados (Liu et al., 2017).

Misturas de metais podem induzir efeitos de intensidade maiores ou menores do que os valores previstos pelos modelos ao somar as respostas biológicas de metais individuais (Liu et al., 2017). De acordo com Jonker et al. (2005), pode haver quatro padrões complexos pelos quais os dados observados se desviam dos modelos de referência: sem desvio, sinergismo ou antagonismo (S/A - indicando, respectivamente, efeito mais grave e menos grave do que o calculado pelos modelos AC e AI), desvio dependente do nível de dose (DL - quando há um nível de dose baixa ou alta da mistura) e desvio dependente da proporção de dose (DR - onde os padrões diferem de acordo com a composição da mistura) (Liu et al. , 2017; Loureiro et al., 2010).

Os efeitos tóxicos individuais do manganês e do cromo já foram bem documentados (Lasier et al., 2000; Madoni et al., 1996; Peters et al., 2001; Sanyal et al., 2017; Singh e Kashyap, 1978), mas até o momento ainda não foram realizados estudos sobre os efeitos combinados desses dois metais em organismos aquáticos, apesar do fato de que em ambientes poluídos por escoamentos industriais ou urbanos, é comum a presença de vários tipos de substâncias químicas, incluindo metais. Vários modelos tem sido utilizados para avaliar os efeitos de misturas em organismos aquáticos. Para tóxicos com modos de ação similares que não interagem, efeitos de adição de concentração podem ser esperados. Nesse caso, a toxicidade da mistura equivale à soma das concentrações dos componentes, expressa em unidades de toxicidade (UTs). Desvios da adição de concentração podem ocorrer quando os tóxicos interagem e podem resultar em toxicidade mais acentuada ou menos acentuada do que o previsto. Na literatura, os termos sinergismo e antagonismo tem sido frequentemente utilizados (às vezes incorretamente) para descrever interações mais acentuadas e menos acentuadas (Franklin et al., 2002).

1.5. Algas na Ecotoxicologia – Foco em contaminação por metais

As algas unicelulares apresentam alta superfície de contato em relação ao seu volume, o que contribui para o aumento da sua exposição aos contaminantes (Melegari et al., 2013). As microalgas são algas cujo tamanho varia de 0,2 µm (picoplâncton) a 100 µm (formas filamentosas) (Markou et al., 2012). Esses organismos são essenciais para a manutenção do balanço ecológico nos ecossistemas aquáticos, uma vez que são produtores primários, fornecendo oxigênio e substâncias orgânicas para outras formas

de vida (Alho et al., 2019; Carfagna et al., 2013). Além disso, as microalgas têm sido muito utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, pois são sensíveis a diversos poluentes (Herlory et al., 2013; Mansano et al., 2017; Moreira et al., 2020), são base de cadeia alimentar (Melegari et al., 2013), além de serem de fácil cultivo e rápido crescimento. A sensibilidade das microalgas a um composto tóxico é espécie-específico (Rojíčková-Padrtoová & Maršálek, 1999). Sendo assim, poucas espécies de microalgas de água-doce são consideradas como organismos-modelo para ensaios ecotoxicológicos, por exemplo, *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris*. Essas espécies cumprem três requisitos básicos para uma espécie-modelo de microalga: são unicelulares, não formam agregados em cultura, são fáceis de manter em condições controladas de laboratório e são sensíveis a muitos contaminantes (Expósito et al., 2017).

Chlorophyceae é uma classe de algas verdes geneticamente, morfologicamente e ecologicamente diversas. O grupo é dominante, particularmente em água doce, e desempenha papéis importantes nos ecossistemas globais. As clorofíceas são compostas de cinco ordens taxonômicas: Sphaeropleales, Chlamydomonadales, Chaetophorales, Chaetopeltidales e Oedogoniales. As Sphaeropleales são um grande grupo e contêm algumas das espécies de água doce mais comuns (por exemplo, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Tetradismus* e *Raphidocelis*) (Suzuki et al., 2018).

A exposição de microalgas a metais pesados pode causar inibição de crescimento, suprimir a divisão celular, reduzir a atividade fotossintética e restringir atividades enzimáticas (Bashir et al., 2021). A fotossíntese é um processo que começa com a utilização da luz solar para a oxidação de moléculas de água. A energia química armazenada nesta oxidação endergônica é processada através da cadeia de transporte de elétrons dos tilacóides do cloroplasto e, eventualmente, é entregue na forma de um redutor (ferredoxina reduzida) e de ligações de fosfato de alta energia (Adenosina trifosfato - ATP). A absorção de luz e a conversão da energia de excitação em energia química ocorre nos fotossistema-II (FSII) e fotossistema-I (FSI) nas membranas dos tilacóides (Melis, 1999).

Quando expostos à luz, todos os organismos fotossinteticamente ativos emitem fluorescência, que se origina principalmente de uma molécula de clorofila *a* do FSII (Mallick & Mohn, 2003). A energia luminosa absorvida pelas moléculas de clorofila pode ter um de três destinos: 1) pode ser usada para conduzir a fotossíntese

(fotoquímica); 2) o excesso de energia pode ser dissipado como calor; 3) ou pode ser reemitido como fluorescência de luz da clorofila. Esses três processos ocorrem em competição, de forma que qualquer aumento na eficiência de um resultará na diminuição do rendimento dos outros dois (Maxwell & Johnson, 2000).

O FSII é a enzima fotossintética encontrada em plantas, algas eucarióticas e cianobactérias, que usam energia solar para extrair elétrons da água (Derks et al., 2015). As algas possuem dois centros de reação (CR) que atuam juntos: o P680 (CR do FSII) e o P700 (CR do FSI) (Giardi et al., 2001). O FSII tem três domínios principais: i) a clorofila “antena” e outros pigmentos que absorvem e transferem a energia dos fótons para os ii) centros de reação (CR), onde o elétron excitado de um par especial de clorofilas *a* é transferido para uma série de elétrons aceptores; o poder oxidante excepcionalmente forte do CR do FSII conduz iii) a extração de elétrons da água dentro do complexo de evolução do oxigênio (CEO) (Derks et al., 2015). Em resumo, a energia de excitação no CR P680 (centro de reação do PSII) leva à uma separação de cargas entre o FSII e a feofitina, seguida pela transferência de elétrons da feofitina reduzida (Feo^-) para a quinona A (Q_A), e da Q_A^- para a quinona B (Q_B). No lado doador do FSII, a carga positiva do P680^+ é neutralizada pela transferência de elétrons da tirosina (Tir_Z). A doação de elétrons a partir do CEO, que possui 4 átomos de Mn, para a Tir_Z serve tanto para armazenar o equivalente oxidante quanto para neutralizar as moléculas doadoras de elétrons primárias (P680) e secundárias (Tir_Z). A acumulação gradual de quatro cargas positivas no CEO constitui uma condição necessária, e suficiente, para a oxidação de duas moléculas de H_2O , a liberação de quatro elétrons, quatro prótons e a formação do O_2 molecular. Este conjunto de reações constitui uma conversão bem-sucedida de energia de excitação em potencial químico (Melis, 1999).

Duas estratégias principais surgiram dentro do cloroplasto, a nível molecular pós-translacional, para dissipar (o chamado *quenching* ou decaimento) o excesso de energia da luz absorvida, para a salvaguardar o FSII. Uma estratégia é aumentar a desexcitação fotoquímica da clorofila do centro de reação recirculando elétrons dentro desse CR do FSII, e / ou passando elétrons para aceptores de elétrons alternados dentro do cloroplasto. A outra estratégia é diminuir a excitação do FSII como fonte dentro do sistema antena, normalmente através da conversão inofensiva da energia luminosa absorvida em calor (Derks et al., 2015).

Investigar os efeitos tóxicos de metais no crescimento e atividade fotossintética de microalgas pode influenciar substancialmente processos de avaliação de risco ecológico de metais pesados (Bashir et al., 2021). Para avaliar o impacto de metais na atividade fotossintética de algas e plantas, a fluorometria de pulso de amplitude modulada (*pulse amplitude modulated* - PAM) tem se destacado como uma técnica rápida, simples e sensível na ecotoxicologia, além da vantagem de ser não invasiva (Herlory et al., 2013; Juneau et al., 2002). Entre os parâmetros medidos por um fluorômetro de pulso de amplitude modulada estão a fluorescência inicial (ou mínima) das células algais adaptadas ao escuro (F_0), fluorescência máxima das algas adaptadas ao escuro (F_M), e a fluorescência variável, obtida pela diferença entre a F_M e F_0 (Genty et al., 1989; Maxwell & Johnson, 2000). Também são obtidos dados de eficiência máxima fotossintética (Φ_M) das algas adaptadas ao escuro, que indica a quantidade de luz que foi realmente utilizada na fotossíntese (Herlory et al., 2013), ou seja, a eficiência quântica caso todos os CR do FSII estivessem abertos (Maxwell & Johnson, 2000). Através da emissão de fluorescência das células algais adaptadas ao escuro, pode-se calcular também a eficiência do CEO do FSII (F_0/F_V) (Kriedemann et al., 1985).

Outra vantagem do uso do fluorômetro PAM é a obtenção de dados de fluorescência da clorofila *a* de células algais adaptadas à luz, através da cinética de indução de fluorescência (Herlory et al., 2013). São obtidos dados de fluorescência inicial na luz (F_S) e fluorescência máxima na luz (F'_M), que permitem o cálculo da fluorescência variável no estado adaptado à luz (F'_V). Além desses parâmetros, também são determinados os valores de rendimento efetivo (Φ'_M) das algas adaptadas à luz, decaimento (*quenching*) fotoquímico (qP) e decaimentos (*quenchings*) não fotoquímicos (qN e NPQ). O Φ'_M está relacionado com a atividade fotossintética, podendo fornecer medidas da taxa de transporte de elétrons linear nas células algais adaptadas à luz (Maxwell & Johnson, 2000). O qP estima a habilidade da fotoquímica de competir por energia quântica aprisionada, ou seja, representa a proporção de energia de excitação capturada pelo CR do FSII que é utilizada para o transporte de elétrons (Genty et al., 1989; Herlory et al., 2013; Juneau et al., 2002). O qN reflete a dissipação de energia luminosa não relacionada com a fotoquímica (Juneau et al., 2002). O NPQ, outro parâmetro de medida de *quenching* ou decaimento não fotoquímico, representa o aumento relativo na soma de taxas de ativação de processos não-fotoquímicos (por

exemplo: fluorescência, dissipação por calor e energia de excitação transferida do FSII para o FSI) (Cosgrove & Borowitzka, 2010; Miao et al., 2005).

O valor nutricional de uma alga depende de diversas características. Mas é a composição bioquímica que atua como determinante ao estabelecer a qualidade nutricional que será transferida para outros níveis tróficos da cadeia alimentar. Dessa forma, um estresse ambiental que afete a composição bioquímica da alga terá um impacto crucial no seu valor nutricional (Rodríguez et al., 2007). É de suma importância que os estudos ecotoxicológicos detectem e avaliem essas alterações bioquímicas, uma vez que as algas são produtores primários e qualquer impacto a nível bioquímico pode ser transferido para outros níveis tróficos, podendo afetar toda a comunidade aquática (Alho et al., 2020). Muitos parâmetros bioquímicos tem sido utilizados como ferramentas eficientes para monitorar a toxicidade de metais e outros contaminantes, pois auxiliam no entendimento dos processos envolvidos na exposição a estressores ambientais (Moreira et al., 2020).

A composição de classes lipídicas pode variar em decorrência de alterações nas condições ambientais ou de cultivo, como pH, temperatura, intensidade luminosa, nutrientes, entre outros (Dunstan et al., 1993; Reis et al., 2021). Entre os principais grupos orgânicos presentes na biomassa algal, os mais ricos em energia são os lipídios, seguidos pelas proteínas e carboidratos (Wilhem e Jakob, 2011). Muitas espécies de algas são capazes de alterar a produção de carboidratos de acordo com as condições do ambiente, de maneira adaptativa, principalmente quando estão sob estresse. Essas biomoléculas são compostos de armazenamento, e fornecem energia para os processos metabólicos (Markou et al., 2012). Sob exposição de metais, algumas microalgas tendem a aumentar a síntese de carboidratos (Chia et al., 2015; Pistocchi et al., 1997), como mecanismo de defesa, ou podem reduzir a produção desse componente em resposta aos efeitos tóxicos do metal em questão (Lim et al., 2006; Martínez-Ruiz & Martínez-Jerónimo, 2015). Em alguns casos, um aumento na síntese de carboidratos em resposta à exposição de um metal é acompanhada do aumento da produção de lipídios (Rocha et al., 2016).

Os lipídios são componentes estruturais das membranas celulares e de várias organelas, além de auxiliar no controle do movimento de substâncias para o interior das células (Vidotti & Rollemberg, 2004). Os lipídios produzidos pelas microalgas (lipídios

polares, neutros, ésteres de cera, esteróis, hidrocarbonetos) podem ser agrupados em duas categorias: lipídios de armazenamento (não polares) e lipídios estruturais (polares) (Sharma et al., 2012). Entre os lipídios não polares, TAG tem sido reportado como uma boa ferramenta para avaliação de estresse causado por metais, pois tende a ter sua concentração aumentada sob exposição à esses compostos (Chia et al., 2013; Liu et al., 2008). Os lipídios polares, como fosfolipídios e esteróis, além de importantes componentes estruturais da membrana celular, auxiliam em uma grande variedade de processos metabólicos (Sharma et al., 2012).

Como base no exposto até aqui, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos tóxicos de um metal essencial, o Mn, e um não essencial, o Cr(III), de forma individual e combinada, sobre a clorófitica *R. subcapitata*. Para isso foram avaliados os efeitos dos metais isolados e em mistura a nível populacional (crescimento), morfológico (complexidade e tamanho celular), intracelular (fluorescência da clorofila *ae* produção de ROS), atividade fotossintética (rendimentos máximo e efetivo, eficiência do complexo de evolução do oxigênio, decaimentos fotoquímico e não-fotoquímicos) e a nível de compostos de reserva e energia (carboidratos totais, lipídios totais e classes lipídicas). Além disso, foram construídas curvas de distribuição de sensibilidade das espécies (*Species Sensitivity Distribution* - SSD) para determinar as sensibilidades da *R. subcapitata* ao Mn e Cr em comparação com outros organismos aquáticos. Sendo assim, este trabalho fornece informações sobre os riscos potenciais da toxicidade do Mn e Cr, isolados e em mistura, em ecossistemas de água doce.

1.6. Estruturação da Tese

Esta tese foi estruturada em capítulos, de forma a facilitar a publicação dos resultados. Sendo assim, cada capítulo foi redigido em inglês, contendo Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão, Referências e Material Suplementar. Cada capítulo está ordenado em função da fase de desenvolvimento da pesquisa, sendo o primeiro capítulo referente aos efeitos dos metais isolados e em mistura sobre o crescimento, estresse oxidativo e morfologia da alga. O segundo capítulo aborda os efeitos do Mn e do Cr, individualmente e combinados, sobre a atividade fotossintética da microalga, e o terceiro capítulo se refere ao impacto dos metais isolados e combinados sobre a produção de compostos de reserva de energia da

clorofícea. O capítulo 1 (Individual and combined effects of manganese and chromium on a freshwater Chlorophyceae) foi aceito para publicação na revista *Environmental Toxicology and Chemistry*, e está referenciado nos capítulos 2 e 3 como Alho et al., 2022. As conclusões finais da tese foram elaboradas com base nesses três capítulos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho visou investigar os efeitos tóxicos de um metal essencial, Mn, e um não essencial, Cr, isolados e em mistura, sobre uma clorofícea de água doce. Os efeitos foram avaliados a nível de crescimento, estresse oxidativo, clorofila, atividade fotossintética e produção de biomoléculas da alga.

1.1. Objetivos específicos

- Cultivar a alga *Raphidocelis subcapitata* em meio de cultivo próprio para clorofíceas.

- Analisar os efeitos tóxicos do cloreto de manganês ($MnCl_2$) e do cloreto de cromo ($CrCl_3$) isoladamente e em mistura sobre o crescimento, produção de clorofila, tamanho celular, complexidade celular e estresse oxidativo da microalga.

- Analisar os efeitos tóxicos do cloreto de manganês ($MnCl_2$) e do cloreto de cromo ($CrCl_3$) isoladamente e em mistura sobre a atividade fotossintética da clorofícea.

- Analisar os efeitos tóxicos do cloreto de manganês ($MnCl_2$) e do cloreto de cromo ($CrCl_3$) de forma isolada e combinada sobre os compostos de reserva de energia da microalga.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo da microalga em condições controladas de laboratório

O inóculo da microalga *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) Nygaard, Komárek, J.Kristiansen & O.M.Skulberg (Chlorophyceae) foi obtido junto ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). Soluções-estoque foram mantidas em meio de cultivo CHU-10/2 (Nalewajko e O'Mahony, 1989). A microalga foi cultivada em pH 7,0, sob condições controladas de intensidade luminosa ($\cong 3900$ lux, luz fluorescente) e temperatura ($25 \pm 0,5$ °C), com fotoperíodo de 12 h/12 h claro/escuro. As culturas foram gentilmente agitadas manualmente 6 vezes por dia (US EPA, 2012). O meio de cultivo foi autoclavado por 20 min (à 121 °C e 1 atm acima da pressão padrão) antes do uso, e materiais esterilizados foram utilizados durante todo o experimento para evitar contaminação da cultura.

3.2. Testes Ecotoxicológicos com a microalga

Soluções-padrão Titrisol de MnCl_2 (1000 mg L⁻¹) e CrCl_3 (1000 mg L⁻¹) foram utilizadas como soluções-estoque (Merck, Alemanha). Os experimentos tiveram duração de 96 h e cada tratamento foi constituído por 3 réplicas. As culturas da alga em fase exponencial de crescimento foram inoculadas em uma concentração inicial de 5×10^4 células mL⁻¹ em Erlenmeyers de policarbonato de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL das soluções-teste. A alga foi exposta às concentrações isoladas de Mn (controle – 0.009 μM de Mn e sem adição de Cr; 1.45, 3.64, 7.28 e 14.56 μM Mn) e Cr (3.84, 7.68, 15.36 e 19.2 μM Cr) e às concentrações combinadas dos dois metais (design *full factorial*, resultando em 16 tratamentos dos metais em mistura; Fig. S1, Material suplementar do Capítulo 1). O controle continha apenas a concentração de Mn presente no meio de cultivo CHU-10/2, sem Mn extra adicionado, e as concentrações de ambos os metais foi escolhida com base nos resultados de testes preliminares. A taxa relativa de crescimento (TRC) de cada tratamento foi calculada com base na equação abaixo, descrita em Bao et al. (2011):

$$\text{TRC} = (\text{N}_t - \text{N}_0)_{\text{tratamento}} / (\text{N}_t - \text{N}_0)_{\text{controle}} \quad (\text{eq. 1})$$

onde N_t = densidade de células no tempo t ; N_0 = densidade de células inicial; e t = duração da exposição.

3.3. Densidade celular e medidas de espécies reativas de oxigênio

Para a determinação da densidade celular as células foram contadas utilizando-se citometria de fluxo (em aparelho FACS Calibur, Becton Dickinson, FL3 channel), que detecta a fluorescência da clorofila das células vivas. A vantagem da citometria de fluxo é a contagem mais rápida e precisa das algas, pois não conta as células mortas. Para isso, foram retirados 1,8 mL de cada amostra e fixados com 0,2 mL de formol 10%. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -20°C até o dia da leitura. O parâmetro morfológico utilizado para a contagem foi o Side Scatter (SSC), adequado para amostras planctônicas, e a leitura da fluorescência foi realizada no canal FL3-H (fluorescência vermelha).

As medidas de ROS relativo seguiram os procedimentos descritos por Hong et al (2009), com as seguintes modificações: durante as medidas diárias dos testes, 5 μL do corante 2',7' – diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (CAS 2044-85-1, Sigma Aldrich) diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) ($10^4 \mu\text{M}$) foram adicionados à 495 μL de cada amostra, de forma a se obter uma concentração final de 10 μM . As amostras foram incubadas por uma hora no escuro, à temperatura ambiente, e após foram analisadas no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para a determinação do ROS relativo, foram utilizados os parâmetros FL3-H e FL1-H (fluorescência verde) (Sarmiento et al., 2008). Tanto para as leituras de contagem de células quanto para determinação de ROS, imediatamente antes da análise no citômetro, foram adicionados às amostras 10 μL de microesferas fluorescentes de 6 μM (*Fluoresbrite carboxylate microspheres*; Polysciences, Warrington, Pennsylvania, EUA), como padrão interno. A intensidade da fluorescência emitida pelo DCF foi medida no comprimento de onda de emissão de 530 nm e excitação de 488 nm (Hong et al., 2009). Os dados foram analisados no software FlowJo, versão 10.0 (Treestar.com, EUA).

O ROS relativo foi calculado utilizando-se as seguintes equações (Hong et al., 2009):

$$FL1-H_{\text{relativo}} = \log(FL1-H_{\text{amostras}})/\log(FL1-H_{\text{microesferas}}) \quad (2)$$

$$ROS_{\text{relativo}}(\%) = (FL1-H_{\text{relativo/tratamentos}})/FL1-H_{\text{relativo(controle)}} \times 100 \quad (3)$$

3.4. Atividade fotossintética da alga

Os parâmetros de fluorescência da Chl *a* foram determinados para cada tratamento utilizando-se um fluorômetro de pulso de amplitude modulada (PHYTO-PAM® Fluorometer Analyzer, Heinz Walz, Alemanha) com uma unidade óptica ED-101US / MP. Três mL de amostras de cada réplica dos tratamentos foram adaptados ao escuro por 15 minutos, para permitir a oxidação completa dos centros de reação do fotossistema II. Os parâmetros fotossintéticos das células algais adaptadas ao escuro foram medidos diariamente, enquanto os parâmetros fotossintéticos das células adaptadas à luz foram medidos em 72 hrs de exposição aos metais (isoladamente e em mistura), após um período de aclimação ao escuro de 15 minutos.

A fluorescência mínima (ou inicial) das células de algas adaptadas ao escuro (F_0) foram medidas utilizando-se luz modulada de baixa intensidade ($<0,3 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Genty et al., 1989), a fim de se evitar a redução do aceptor de elétrons primário do FSII (a Q_A). A fluorescência máxima da alga adaptada ao escuro (F_M) foi quantificada pela redução completa de todas as Q_A , usando-se um pulso curto de saturação de luz ($2000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Pela diferença entre F_0 e F_M , a fluorescência variável (F_V) foi determinada e o Φ_M do FSII (F_V/F_M) foi calculado (Schreiber, 1986; Schreiber & Bilger, 1993). A eficiência do complexo de evolução do oxigênio (CEO) (F_0/F_V) também foi calculada a partir da emissão de fluorescência de células algais aclimatadas ao escuro (Kriedemann et al., 1985).

Os parâmetros de performance fotossintética da microalga foram obtidos a partir da cinética de indução de fluorescência (Herlory et al., 2013). Amostras aclimatadas ao escuro foram iluminadas por uma luz actínica em uma intensidade de $128 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ seguida pela aplicação de um pulso de saturação a cada 20 s, durante 15 min.. Dos valores de fluorescência inicial na luz (F_S) e fluorescência máxima na luz (F'_M), os parâmetros de fluorescência variável no estado adaptado à luz ($F'_V = F'_M - F_S$), coeficiente de decaimento (*quenching*) fotoquímico (qP), coeficientes de decaimento não

fotoquímicos (qN e NPQ), e o Φ'_M do FSII foram calculados. Os valores de F_0 , F_M , Φ_M , F'_M e Φ'_M foram fornecidos pelo equipamento.

3.5. Compostos de reserva de energia

A quantificação dos compostos de reserva energética foi baseada nas determinação da concentração de carboidratos totais, lipídios totais e classes lipídicas. Isso foi realizado para cada réplica do controle e tratamentos com Mn e Cr, isolados e em mistura, após 96 h de exposição.

Os carboidratos totais foram quantificados acordo com os procedimentos descritos em Liu et al. (1973). O método é baseado na reação de fenol e ácido sulfúrico. A dextrose anidra (Mallinckrodt Chemicals, EUA) foi utilizada como padrão para a curva de calibração. Um espectrofotômetro (HACH DR 5000; HACH Company, Loveland, CO, EUA) foi usado para leituras das amostras em comprimento de onda de 485 nm.

A extração e quantificação dos lipídios totais e classes lipídicas seguiram a metodologia descrita em Parrish (1999). Um volume de 120 mL de cada amostra foi filtrado em filtros de fibra de vidro previamente calcinados (400 °C, 8 h) (Macherey-Nagel, Alemanha) e armazenados em frascos de vidro previamente lavados com metanol e clorofórmio. Para a preservação dos lipídios, foi adicionado clorofórmio e as amostras foram concentradas em nitrogênio gasoso, antes de serem armazenadas por um período não maior que 3 dias, a -20 °C, até a extração. No dia de extração, foram adicionados metanol e água (*chloroform-extracted water*) na proporção de 2:1:1 (clorofórmio:metanol:água), as amostras foram maceradas, sonicadas por 5 min (Grupo Unique, Indaiatuba, Brasil), seguido por 2 minutos de centrifugação a 3000 rpm (Eppendorf 5702R, Alemanha). O processo de adição de metanol, uso de sonicador e centrífuga foi repetido por mais três vezes. Em seguida, as amostras foram concentradas em evaporador rotativo (RV05 S25, IKA, Alemanha) até o volume final de 0,5 mL. Um Iatroscan MK6 (Mitsubishi, Kagaku Iatron Inc., Tóquio, Japão), que consiste em cromatografia de camada delgada com detecção por ionização de chama (TLC / FID), foi usado para detecção de classes lipídicas. Essa determinação foi baseada em uma curva de calibração utilizando um padrão de lipídios mistos (Sigma-Aldrich, EUA). As

áreas dos picos foram registradas e processadas utilizando-se o software PeakSimple (versão 4.444).

3.6. Determinação da concentração de metal

As concentrações totais de manganês e cromo no grupo controle e todas em as soluções-teste dos tratamentos, bem como nas soluções-estoque de Mn e Cr, foram medidas por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, iCAP 7000 Series, Thermo Scientific) (Tabela S2, Material suplementar do capítulo 1). As amostras foram acidificadas a 1% de HNO₃ e mantidas congeladas (-20 °C) até serem analisadas. As concentrações nominais foram usadas em nosso estudo para calcular os resultados, pois diferiram em menos de 20% das concentrações medidas (Tabela S2, Material suplementar), conforme recomendado pela OCDE (2002).

3.7. Análises dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SigmaPlot versão 11.0 (Systat 2008). Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância. Os resultados com distribuição normal foram analisados utilizando-se o *One Way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. Os dados com distribuição não normal ou variância desigual foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis e o teste não paramétrico de Dunn. Os valores IC₅₀, IC₂₀ e IC₁₀ (valor \pm desvio-padrão) foram calculados por regressão não linear, usando uma curva logística sigmoidal de três parâmetros no software Statistica 7.0 (Statsoft 2004). A concentração de efeito não observável (CENO) e a menor concentração de efeito observável (CEO) foram determinadas estatisticamente ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CAPÍTULO 1: Efeitos individuais e combinados de manganês e cromo em uma clorófitca de água doce

Resumo

Manganês (Mn), um metal essencial em quantidades traço, e Cromo (Cr), um metal não essencial para alga, são frequentemente encontrados em despejos de efluentes e podem co-ocorrer em ambientes aquáticos contaminados. Sendo assim, nós objetivamos investigar os efeitos de Mn e Cr, e a mistura desses metais, sobre a clorófitca *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyceae) utilizando uma abordagem com múltiplos endpoints. Com relação aos efeitos da exposição individual dos metais, o Mn foi 4 vezes mais tóxico ($IC_{50-72\text{ h}} = 4.02 \pm 0.45 \mu\text{M Mn}$) que o Cr ($IC_{50-72\text{ h}} = 16.42 \pm 4.94 \mu\text{M Cr}$) para a microalga, considerando os efeitos na taxa relativa de crescimento. Além disso, essa espécie foi a mais sensível ao Mn, de acordo com a curva de sensibilidade das espécies (*Species Sensitivity Distribution* - SSD). De maneira geral, os metais testados não levaram à alterações significativas na produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species* - ROS), complexidade celular e tamanho celular relativo, mas reduziu significativamente o crescimento algal e a média celular da fluorescência da clorofila *a* (Clo *a*) nas concentrações mais altas (3.64 - 14.56 μM de Mn, e 15.36 - 19.2 μM de Cr). A redução da média celular da fluorescência da Clo *a* indica um impacto na síntese de pigmentos, o que pode estar relacionado com a redução de crescimento observada. Nos testes da mistura, os modelos de referência Adição de Concentração (AC) e Ação Independente (AI) foram utilizados para analisar os dados, e o modelo AI foi o que melhor explicou os resultados. Dessa forma, a mistura de Mn e Cr é não-interativa, apresentando efeitos aditivos. Esse é o primeiro estudo abordando a toxicidade combinada de Mn e Cr em uma clorófitca de água doce.

Palavras-chave: Toxicidade de metais; Misturas; *Raphidocelis subcapitata*; Ecotoxicologia; Distribuição de Sensibilidade das Espécies; Aditividade.

1. INTRODUÇÃO

Contaminação por metais em ecossistemas aquáticos podem ocorrer a partir de várias fontes, e uma vez que esses compostos não podem ser degradados, eles podem bioacumular e causar toxicidade à organismos não alvo (Liu et al., 2017). A biota em corpos de água poluídos frequentemente entram em contato com a mistura desses metais, não somente com os compostos isolados. Sendo assim, para estabelecer um cenário mais realista, estudos investigando as interações e efeitos de toxicidade de misturas de contaminantes tem sido encorajados (Loureiro et al., 2010; Liu et al., 2017; Nys et al., 2018), embora critérios para análise de qualidade da água são geralmente estabelecidos com base na toxicidade de compostos isolados (Keller e Zam, 1991).

Manganês (Mn) é um metal essencial para vários organismos, e é um importante constituinte de diversas enzimas e co-fatores (Harford et al., 2015), por exemplo, é necessário na célula para catalizar a evolução do oxigênio no processo fotossintético (Knauer et al., 1999), o que é essencial para a separação da molécula de água no fotossistema II e para a superóxido desmutase (Sharma et al., 2020). O Mn existe primariamente nos estados de oxidação Mn (II) – solúvel – e Mn (IV) – insolúvel -, este último sendo menos biodisponível e tóxico (Harford et al., 2015). Apesar de ser essencial em quantidades traço, altas concentrações desse metal podem ser tóxicas para muitos organismos, como algas – afetando mais a síntese de clorofila do que o crescimento (Fargašová et al., 1999). A toxicidade do Mn tem sido reportada para Rotifera (Couillard, 1989), crustáceos (Lasier et al., 2000), ostras (Calabrese et al., 1973) e peixes (Lewis, 1978). Além disso, o Mn é frequentemente encontrado em descargas de mineração, fundição, e outros processos industriais (Singh e Kashyap, 1978; Harford et al., 2015; Švec et al., 2016). De fato, Hossain et al. (2021) reportaram concentrações de Mn na água superficial do Canal Kutubdia (Bangladesh) variando de 1.53 a 1.64 μM . Em um riacho brasileiro contaminado por atividades de mineração de carvão, níveis de Mn foram detectados em concentrações de até 19,65 μM (Oliveira et al., 2016). Além disso, no Quênia, foram reportadas concentrações de íons de Mn no rio Nairobi de até 78,6 μM (Kakoi et al., 2016).

O cromo (Cr) é um metal amplamente utilizado em várias indústrias, como metalúrgica, refratária, e (tingimento têxtil, liga, galvanoplastia, curtimento e outros), o que contribui para as grandes quantidades de descargas de compostos com Cr no meio ambiente (Kotás et al., 2000; Aharchaou et al., 2017; Toranzo et al., 2020). Os estados

de oxidação mais comuns no ambiente são Cr (III) e Cr (VI), com diferentes mobilidades, biodisponibilidades e toxicidades (Aharchaou et al., 2017). O Cr (VI) tem sido relatado como extremamente tóxico para protozoários (Madoni et al., 1996), cianobactérias (Rodgher et al., 2012), algas (Rosícková-Padrťová, 1999), moluscos (Keller e Zam, 1991), crustáceos (Martínez-Jerónimo et al., 2006) e peixes (Sanyal, 2017) devido ao seu elevado potencial de oxidação e capacidade de atravessar membranas biológicas. Os mecanismos de entrada do Cr (III) nas células ainda não estão completamente compreendidos (Aharchaou et al., 2017). Em corpos de água doce não poluídas, as concentrações de Cr podem variar de 1 a 10 μM . No entanto, em águas poluídas os níveis podem ser tão altos quanto 1,5 a 48 mM, como os valores reportados para efluentes de fábricas de papel e efluentes de curtumes, respectivamente (Cervantes et al., 2001; Rodríguez et al., 2007). De acordo com Sánchez-Fortún (2009), efluentes não tratados de descargas industriais contêm aproximadamente 1.53 – 1,92 mM desse metal. Elystia e colaboradores (2020) reportaram concentrações de Cr (III) e Cr (VI) de 0,017 e 0,476 mM, respectivamente, em efluentes de galvanoplastia de uma indústria de cromagem. Concentrações de Cr (VI) variando de 0.096 a 4.82 μM foram detectadas em quatro rios principais (Luo River, Xingzi River, Bali River and Wuding River) no planalto de Loess, China (He et al., 2020).

Fontes de contaminação de metal raramente produzem resíduos de um único metal (Keller e Zam, 1991). De acordo com a Agência Nacional de Mineração do Brasil (Brazil, 2019), a quantidade de Mn e Cr (ROM, *run of mine*) produzida em 2018 no país foi de 5.573.837 e 1.496.425 t, respectivamente, o que destaca os riscos de contaminação ambiental. Recentemente, dois grandes desastres ambientais ocorreram nas cidades brasileiras de Mariana (em 2015) e Brumadinho (em 2019), onde duas barragens de mineradoras romperam liberando grandes quantidades de produtos químicos, incluindo metais, nos rios próximos a essas cidades (Fernandes et al., 2016; Lopes et al., 2019). Como o Mn e o Cr geralmente estão presentes em descargas de efluentes industriais e domésticos (Harford et al., 2015; Aharchaou et al., 2017), esses metais podem acabar co-ocorrendo em ambientes aquáticos.

As microalgas são organismos facilmente cultivados que levam a um crescimento rápido em condições controladas de laboratório (Rodgher et al., 2012; Gebara et al., 2020). Além disso, esses organismos são conhecidos por terem grande sensibilidade a metais e outros contaminantes químicos, onde são detectados efeitos

rápidos no crescimento (Rodgher et al., 2012), e em parâmetros fotossintéticos e fisiológicos (Echeveste et al., 2017; Silva et al., 2018), como a produção de Clo *a* e tamanho celular. Além disso, esses microorganismos são uma boa opção para estudos ecotoxicológicos. Os impactos do Cr (VI) em espécies de algas já foram relatados em muitos estudos (Rodríguez et al., 2007; Rodgher et al., 2012; Kováčik et al., 2015), nos quais a formação de ROS foi relatada como a principal causa de toxicidade.

Em contraste, apenas alguns estudos abordam a toxicidade do Cr (III), embora esta forma de Cr seja a mais comum na natureza (Rodríguez et al., 2007). Os dados sobre os efeitos do Mn nas algas ainda são escassos (Švec et al., 2016).

Portanto, tivemos como objetivo investigar os efeitos tóxicos de um metal essencial – Mn – e um metal não essencial – Cr (III) – e a mistura deles sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*. Nossa hipótese é de que o Mn seja mais tóxico para as algas do que o Cr devido ao fato de ser um metal essencial e fazer parte do aparato fotossintético desses organismos (Knauer et al., 1999), possivelmente sendo mais facilmente internalizado pela célula. Para os testes de toxicidade dos metais isolados e em mistura, foram avaliados vários *endpoints* a nível populacional (taxa de crescimento), morfológico (complexidade celular e tamanho celular relativo) e a níveis intracelulares (fluorescência da Clo *a* e produção de ROS). Também foram construídas curvas de Distribuição de Sensibilidade das Espécies (*Species sensitivity distribution - SSD*) para determinar as sensibilidades da *R. subcapitata* ao Mn e ao Cr em comparação com outros organismos aquáticos. Além disso, a microalga foi exposta à mistura binária de Mn e Cr, e os resultados foram analisados em termos de taxa de crescimento relativo. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo sobre os efeitos da mistura de Mn e Cr em uma microalga de água doce, usando uma abordagem de múltiplos *endpoints*. Portanto, nosso estudo contribui com informações sobre os riscos potenciais da toxicidade de Mn e Cr, isolados e combinados, em ecossistemas de água doce.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo das algas

O inóculo da microalga *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) Nygaard, Komárek, J.Kristiansen & O.M.Skulberg (Chlorophyceae) foi obtido junto ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). As culturas estoque foram mantidas em meio de cultivo CHU-10/2 (Nalewajko e O'Mahony, 1989). A microalga foi cultivada em pH 7,0, sob condições controladas de intensidade luminosa (\cong 3900 lux, luz fluorescente) e temperatura ($25 \pm 0,5^\circ\text{C}$), com fotoperíodo de 12 h/12 hrs claro/escuro. Os valores de pH dos tratamentos foram medidos no início e no final dos testes (Tabela S1, Material Suplementar). As culturas foram agitadas manualmente 6 vezes ao dia (US EPA 2012). O meio de cultivo foi autoclavado por 20 min (à 121°C e 1 atm acima da pressão padrão) antes de ser utilizado. Materiais estéreis foram usados durante todo o experimento para evitar a contaminação da cultura.

2.2. Testes de toxicidade dos metais isolados e das misturas

As culturas algais em fase exponencial de crescimento foram inoculadas na concentração de 5×10^4 céls mL^{-1} em Erlenmeyers de policarbonato de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL das soluções teste. As microalgas foram expostas às concentrações de Mn (controle – 0,009 μM de Mn e sem adição de Cr; 1,45; 3,64; 7,28 e 14,56 μM de Mn) e Cr (3,84; 7,68; 15,36 e 19,2 μM de Cr) isolados, e à concentrações combinadas dos dois metais (*design* fatorial completo, resultando em 16 tratamentos dos metais em mistura) (Fig. S1, Material suplementar). O controle continha Mn na concentração originalmente presente no meio de cultivo CHU-10/2 (0,009 μM Mn), sem adição extra de Mn. As faixas de concentração de ambos os metais foram escolhidas com base em resultados de testes preliminares. Soluções-padrão Titrisol de MnCl_2 (1000 mg L^{-1}) e CrCl_3 (1000 mg L^{-1}) foram usadas como soluções-estoque (Merck, Alemanha). Os experimentos tiveram duração de 72 horas e cada tratamento foi composto por 3 réplicas. A taxa relativa de crescimento (TRC) para cada tratamento foi calculada usando a seguinte equação, descrita em Bao et al. (2011):

$$TRC = (N_t - N_0)_{\text{tratamento}} / (N_t - N_0)_{\text{controle}} \quad (\text{eq. 1})$$

onde N_t = a densidade celular no tempo t ; N_0 = a densidade celular inicial; e t = a duração da exposição.

2.3. Análises citométricas

A contagem de células e as medidas de ROS foram realizadas diariamente em um horário fixo utilizando-se um citômetro de fluxo (FACSCalibur - Becton Dickinson, EUA) equipado com um laser de íons de argônio de 15 mW (excitação de 488 nm). As amostras fixadas (495 μ L, fixadas com formaldeído na concentração final de 1%) foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C até a análise. A contagem celular foi realizada de acordo com Sarmiento et al. (2008), usando microesferas fluorescentes de 6 μ m (beads) como padrão interno (Polysciences, Inc., Warrington, PA, EUA). As microalgas foram identificadas em gráficos de dispersão lateral (SSC-H) contra fluorescência vermelha (FL3-H). Os valores médios de FL3-H (média da fluorescência da *Clo a* celular), SSC-H (média da complexidade celular) e FSC-H (média do tamanho celular) das microalgas e das *beads* permitiram o cálculo da média relativa de FL3-H, média do SSC-H relativo e média do FSC-H relativo, conforme descrito em Mansano et al.(2017), que foram expressos em unidades arbitrárias. A avaliação do ROS relativo seguiu os procedimentos descritos detalhadamente em Alho et al. (2019). A aquisição de dados foi feita usando o software CellQuest BD e a análise de citogramas usando o software FlowJo V10. A produção de ROS relativa (%) foi calculada usando as seguintes equações (Hong et al., 2009):

$$FL1-H_{\text{relativo}} = \log (FL1-H_{\text{amostras}}) / \log (FL1-H_{\text{beads}}) \quad (\text{eq. 2})$$

$$ROS_{\text{relativo}} (\%) = (FL1-H_{\text{relativo}}[\text{tratamentos}] / FL1-H_{\text{relativo}}[\text{controle}]) \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

2.4. Determinação da concentração de metal

Para garantir as concentrações reais de cada metal, as concentrações totais de manganês e cromo no grupo controle e todas em as soluções-teste dos tratamentos, bem como nas soluções-estoque de Mn e Cr, foram medidas por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, iCAP 7000 Series, Thermo

Scientific) (Tabela S2, Material suplementar). As amostras foram acidificadas a 1% de HNO_3 e mantidas congeladas ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) até serem analisadas. Conforme recomendado pela OCDE (2002), as concentrações nominais foram usadas em nosso estudo para calcular os resultados, pois diferiram em menos de 20% das concentrações medidas (Tabela S2, Material suplementar).

Levando em consideração que a fração de íons metálicos constitui uma parte importante relacionada à biodisponibilidade dos metais, foi utilizado o programa de equilíbrio químico MINEQL+ (versão 4.62.3; Environmental Research Software, Hallowell, ME, EUA) para estimar a especiação de Mn e Cr nas soluções- teste (Tabelas S3 e S4, Material suplementar). O modelo considera as concentrações totais de ligantes e metais pesados presentes no meio de cultura, bem como as constantes de afinidade entre os diferentes ligantes, metais pesados e constantes do produto de solubilidade.

2.5. Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SigmaPlot versão 11.0 (Systat, 2008). Os resultados foram testados para normalidade e homogeneidade de variância. Onde a ANOVA revelou diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), foi realizado o teste de comparação múltipla post-hoc de Dunnett para determinar quais tratamentos foram significativamente diferentes do grupo controle. Os dados com distribuição não normal ou variância desigual foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste não paramétrico de Dunn. Os valores de IC_{50} , IC_{20} e IC_{10} (valor \pm desvio padrão) foram calculados utilizando-se taxas relativas de crescimento (TRC) por regressão não linear, usando uma curva logística sigmoideal de três parâmetros no software Statistica 7.0 (Statsoft, 2004).

As curvas de Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSD) foram construídas utilizando-se o software ETX, versão 2.0 (Van Vlaardingen et al., 2004). Valores log-normais dos dados de toxicidade de EC/LC/ IC_{50} (Tabelas S5 e S6, Material suplementar) para espécies aquáticas expostas a Mn e Cr foram plotados. Os dados de toxicidade foram compilados a partir de dados da literatura disponíveis, e apenas os resultados de testes de toxicidade realizados em laboratório, para organismos de água doce, que puderam ser confirmados a partir das publicações originais foram incluídos nas curvas SSD. A log-normalidade foi avaliada a um nível de significância de 5% com

o teste de Anderson-Darling (incluído no pacote de software ETX). A HC_5 (*Hazardous concentration* - concentração perigosa para 5% das espécies) e HC_{50} (concentração perigosa para 50% das espécies), bem como seus limites de confiança, também foram calculados, com base na metodologia descrita por Aldenberg e Jaworska (2000).

Os resultados obtidos a partir dos teste de mistura com Mn e Cr foram analisados comparando-se os dados observados com os efeitos previstos dos modelos de referência de Adição de Concentração (AC) (Loewe e Muischnek, 1926) e Ação Independente (AI) (Bliss 1939) usando a ferramenta MIXTOX (Jonker et al., 2005). Na etapa seguinte, os modelos foram estendidos e tanto para CA como para IA, as funções de desvio, como interações sinérgicas/antagonistas (S/A), desvios dependentes da razão de dose (DR) e do nível de dose (DL) foram modelados adicionando-se os parâmetros “a” e “b”, formando uma estrutura aninhada. Em um desvio de S/A, o parâmetro “a” torna-se negativo em interações sinérgicas e positivo em interações antagônicas. No desvio DR, a adição de um segundo parâmetro “ b_{DR} ” pode indicar se o desvio do modelo de referência é controlado pela composição da mistura. Em DL, o parâmetro “ b_{DL} ” é adicionado ao parâmetro “a”, e o valor de “a” determina o desvio em doses baixas e altas (ou seja, $a > 0$ = antagonismo e $a < 0$ = sinergismo). Aqui, o valor de “ b_{DL} ” indica em qual nível de dose o desvio muda. Para informações adicionais, consulte Jonker et al. (2005). Os dados foram ajustados aos modelos de referência e aos desvios e o melhor ajuste foi determinado pelo método da máxima verossimilhança. O melhor modelo descritivo foi identificado estatisticamente.

Além disso, as interações entre as exposições dos metais isolados e em mistura também foram visualmente interpretadas por meio de isobogramas. Um isobograma é a representação gráfica de doses isoladas e combinadas de dois compostos que causam X% de efeito (por exemplo, $X = 50\%$, EC_{50}). O isobograma é representado pelos isóboles de aditividade, sinergismo e antagonismo. Este tipo de representação gráfica não produz barras de erro. No isobograma, as doses do composto A estão representadas na abcissa e as doses do composto B nas ordenadas, e cada ponto representa um par de doses que atingem a EC_{50} quando associadas. No isobograma, juntam-se as EC_{50} das exposições de cada composto isolado, gerando a isobole de aditividade ou linha teórica de aditividade. Os demais valores de EC_{50} obtidos a partir da associação dos compostos em diferentes proporções podem então ser analisados quanto à sua posição frente ao isobol de aditividade. Se esses pontos estiverem

posicionados em torno da isobole de aditividade, a ação é de aditividade; se estão localizados abaixo, a ação é sinérgica e se estão localizados acima, a ação é antagônica. De modo geral, isoboles lineares, côncavas e convexas representam não interação, sinergismo e antagonismo, respectivamente (Kruse et al., 2006; Ryall e Tan., 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação dos testes

Seguindo a recomendação da OECD (2002), os ensaios foram realizados em réplicas para cada concentração de metal nas formas isolada e combinada, e no controle. Foram realizados três testes como réplicas, e durante os experimentos os coeficientes de variação das réplicas nos controles não ultrapassaram 10%, conforme recomendado pelas diretrizes da USEPA (2002). O pH dos tratamentos variou de 6,93 a 8,36 (Tabela S1, Material suplementar) e a temperatura variou de 24,6 a 25,5 °C. O pH não variou em mais de 1,5 unidades nos ensaios (USEPA 2002).

3.2. Toxicidade dos metais isolados

Os dois metais levaram à inibição significativa da TRC da microalga *R. subcapitata* após 72 hrs de exposição (Fig.1, teste de Dunnett, $p < 0,05$). Os dados brutos das TRC das algas expostas entre 24 e 72 hrs ao Mn e Cr estão apresentados na Tabela S7 (Material suplementar). A maior concentração de Mn (14,56 µM) levou a uma redução na TRC de 82,3%. Este metal é necessário para o crescimento das células das algas, mas em altas concentrações torna-se tóxico (Singh e Kashyap, 1978; Millaleo et al., 2010; Švec et al., 2016), como pode ser observado em nossos resultados (Fig. 1A). Singh e Kashyap (1978) reportaram interferência do Mn na replicação do genoma, resultando em morte ou divisão retardada de células de Cyanophyceae. Em plantas, altos níveis de Mn induzem efeitos tóxicos, sendo taxa de crescimento reduzida e clorose nas folhas sintomas comuns (Millaleo et al., 2010). A clorose nas folhas é a diminuição do teor de Clo *a*, semelhante ao que observamos neste estudo no tratamento da microalga com esse metal (Fig. 2A). Portanto, a redução do crescimento da microalga em resposta ao aumento das concentrações de Mn já era esperada.

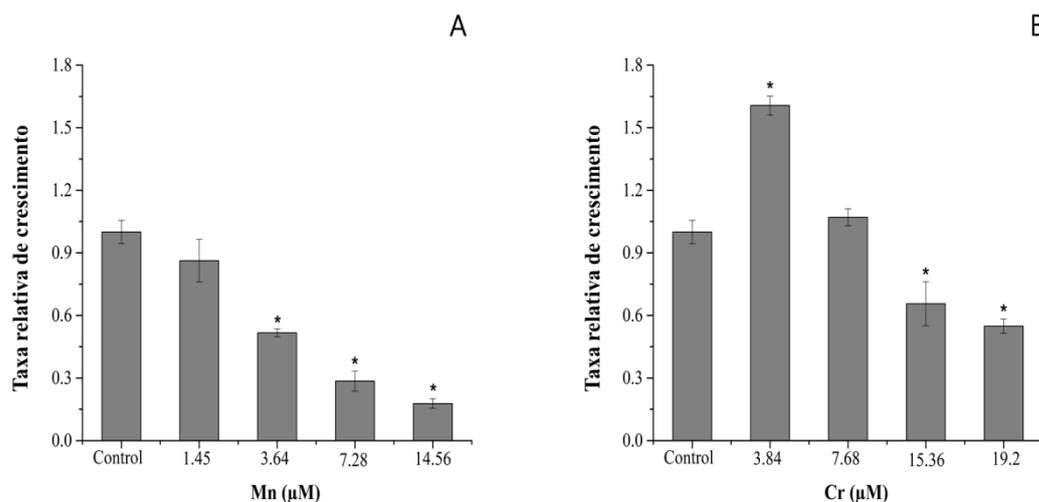


Fig.1: Taxa relativa de crescimento (média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* após 72 hrs de exposição ao manganês (A) e ao cromo (B). As concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferenças significativas quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

A concentração mais baixa de Cr ($3,84 \mu\text{M}$) causou um aumento na TRC da microalga *R. subcapitata* (Fig. 1B), o que sugerimos ser um efeito de hormese (Rand, 1995). A hormese pode ser caracterizada como uma adaptação, como estímulo de funções/endpoints celulares, a um desafio imposto e/ou intrinsecamente gerado. Por meio dessa adaptação, o organismo ou sistema melhora sua capacidade e/ou tolerância para lidar com desafios mais severos (Calabrese et al., 2017). Portanto, não apenas microalgas, mas muitos organismos podem ser estimulados sob exposição à baixas concentrações de produtos químicos (De Schamphelaere e Janssen, 2004). Janson e Cleland (1974) relataram que os íons de Cr trivalente competem com os íons de magnésio (Mg) pela ligação à adenosina di- e tri-fosfato (ADP e ATP, respectivamente), tornando-as indisponíveis para o metabolismo. Além disso, o deslocamento de íons de Mg para Cr(III) pode causar modificações na DNA polimerase e outras atividades enzimáticas (Cervantes et al., 2001), podendo causar danos ao DNA da alga. Isso pode ajudar a explicar a menor TRC das algas nas duas concentrações mais altas de Cr ($15,36$ e $19,2 \mu\text{M}$) no nosso estudo.

A $\text{IC}_{50-72 \text{ hrs}}$ para algas expostas ao Mn foi de $4,02 \pm 0,45 \mu\text{M}$ ($0,22 \pm 0,02 \text{ mg Mn L}^{-1}$), com valores de IC_{20} e IC_{10} de $1,56 \pm 0,24 \mu\text{M}$ ($0,086 \pm 0,013 \text{ mg Mn L}^{-1}$) e

$0,89 \pm 0,18 \mu\text{M}$ ($0,05 \pm 0,010 \text{ mg Mn L}^{-1}$), respectivamente. Esses valores são menores que os relatados em alguns estudos para outras espécies de algas expostas ao Mn, como *Scenedesmus quadricauda* ($\text{IC}_{50-72 \text{ hrs}} = 4,98 \text{ mg Mn L}^{-1}$, Fargašová et al., 1999) e *Chlorella* sp. ($\text{IC}_{50-72 \text{ hrs}} = 25,65 \text{ mg Mn L}^{-1}$, Harford et al., 2015). O tratamento com Cr resultou em uma $\text{IC}_{50-72 \text{ hrs}}$ de $16,42 \pm 4,94 \mu\text{M}$ ($0,85 \pm 0,25 \text{ mg Cr L}^{-1}$), enquanto a IC_{20} foi de $10,11 \pm 3,26 \mu\text{M}$ ($0,52 \pm 0,16 \text{ mg Cr L}^{-1}$). A IC_{10} para o Cr não pôde ser calculada usando o software Statistica (Statsoft, 2004). Esses valores são semelhantes aos relatados por Rojícková-Padrťová e Maršálek (1999) após a exposição de algumas espécies de algas ao Cr ($\text{IC}_{50-72 \text{ hrs}}$ de 0,74 e 0,81 mg Cr L^{-1} para *Scenedesmus subspicatus* e *Chlamydomonas reinhardtii*, respectivamente), mas menor que os valores reportados por esses mesmos autores para *Stichococcus bacillaris* ($\text{IC}_{50-72 \text{ hrs}}$ de 1,64 mg Cr L^{-1}), *Scenedesmus quadricauda* ($\text{IC}_{50-72 \text{ hrs}}$ de 2,52 mg Cr L^{-1}) e para a cianobactéria *Synechococcus leopoliensis* ($\text{IC}_{50-96 \text{ hrs}}$ de 3,31 mg Cr L^{-1}).

Os resultados de $\text{IC}_{50-72 \text{ hrs}}$ permitiram identificar uma maior toxicidade do Mn, ou seja, o Mn foi cerca de 4 vezes mais tóxico para *R. subcapitata* em comparação com o Cr. A forma trivalente de Cr possui baixa permeabilidade de membrana (Baski et al., 2018), o que pode ser um dos motivos para a menor toxicidade deste metal quando comparado ao Mn, no nosso estudo. De acordo com a análise de especiação dos metais no MINEQL+, nos tratamentos com Mn 96,8% do metal adicionado foi dissociado como Mn^{2+} (a forma livre) e 3,0% como $\text{MnSO}_{4(\text{aq})}$ (Tabela S3, Material suplementar). Devido à fraca tendência do Mn de formar complexos orgânicos (ordem de Irving–Williams), assume-se que a concentração de Mn^{2+} livre é aproximadamente a mesma que a concentração total de Mn dissolvido (Knauer et al., 1999), o que é corroborado pelos nossos resultados. Nos tratamentos com Cr, 89% do metal adicionado foi dissociado como $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, 7,3% como $\text{Cr}(\text{OH})_2^{2+}$ e 3,4% como $\text{Cr}(\text{OH})_3(\text{aq})$ (Tabela S4, Material suplementar). Portanto, considerando que o Cr(III) formou complexos hidroxilados no meio de cultura, podemos supor que o fato de as soluções- teste de Mn apresentarem a maior parte da fração metálica em sua forma livre é um dos motivos para a maior toxicidade do Mn em comparação ao Cr(III). Apesar disso, é importante destacar os efeitos negativos das concentrações mais altas de Cr (15,36 e 19,2 μM) na população algal (Fig. 1B).

Tanto o Mn quanto o Cr causaram alterações fisiológicas (fluorescência da Clo *a*) e morfológicas (tamanho celular relativo) na microalga *R. subcapitata* (Fig. 2), com

diferenças em relação ao tempo de exposição e concentrações testadas. Os dados brutos das análises de citometria de fluxo das algas expostas de 0 a 72 hrs ao Mn e ao Cr estão apresentadas na Tabela S8 (Material suplementar). Os dois metais causaram uma redução na fluorescência celular média da Clo *a* nas concentrações mais altas (ao longo das 72 hrs de tratamento), o que pode indicar comprometimento dos processos fotossintéticos. Uma redução na síntese de Clo também foi relatada por Fargašová et al. (1999) ao expor *S. quadricauda* ao Mn²⁺ e por Smythers et al. (2019) após a exposição de *Chlorella vulgaris* a este mesmo metal. A concentração de Cr de 3,84 µM levou a um aumento neste parâmetro após 48 e 72 hrs (Fig. 2B, teste de Dunnett, $p < 0,05$), como uma TRC maior quando comparada ao grupo controle (teste de Dunnett, $p < 0,05$), conforme mencionado anteriormente. Isso reforça nossa sugestão inicial de efeito de hormese. As concentrações mais altas de Cr (7,68; 15,36 e 19,2 µM) reduziram a fluorescência celular média de Clo *a* após 48 e 72 hrs de tratamento (teste de Dunnett, $p < 0,05$). No entanto, a redução da TRC nestas mesmas concentrações foi menos intensa do que a resposta causada pela exposição ao Mn. Além disso, o Mn causou uma redução na síntese de Clo *a* em concentrações mais baixas que o Cr. Isso, combinado com a maior inibição do crescimento da alga em resposta ao Mn, destaca a toxicidade do Mn para esta espécie de alga, corroborando nossa hipótese inicial.

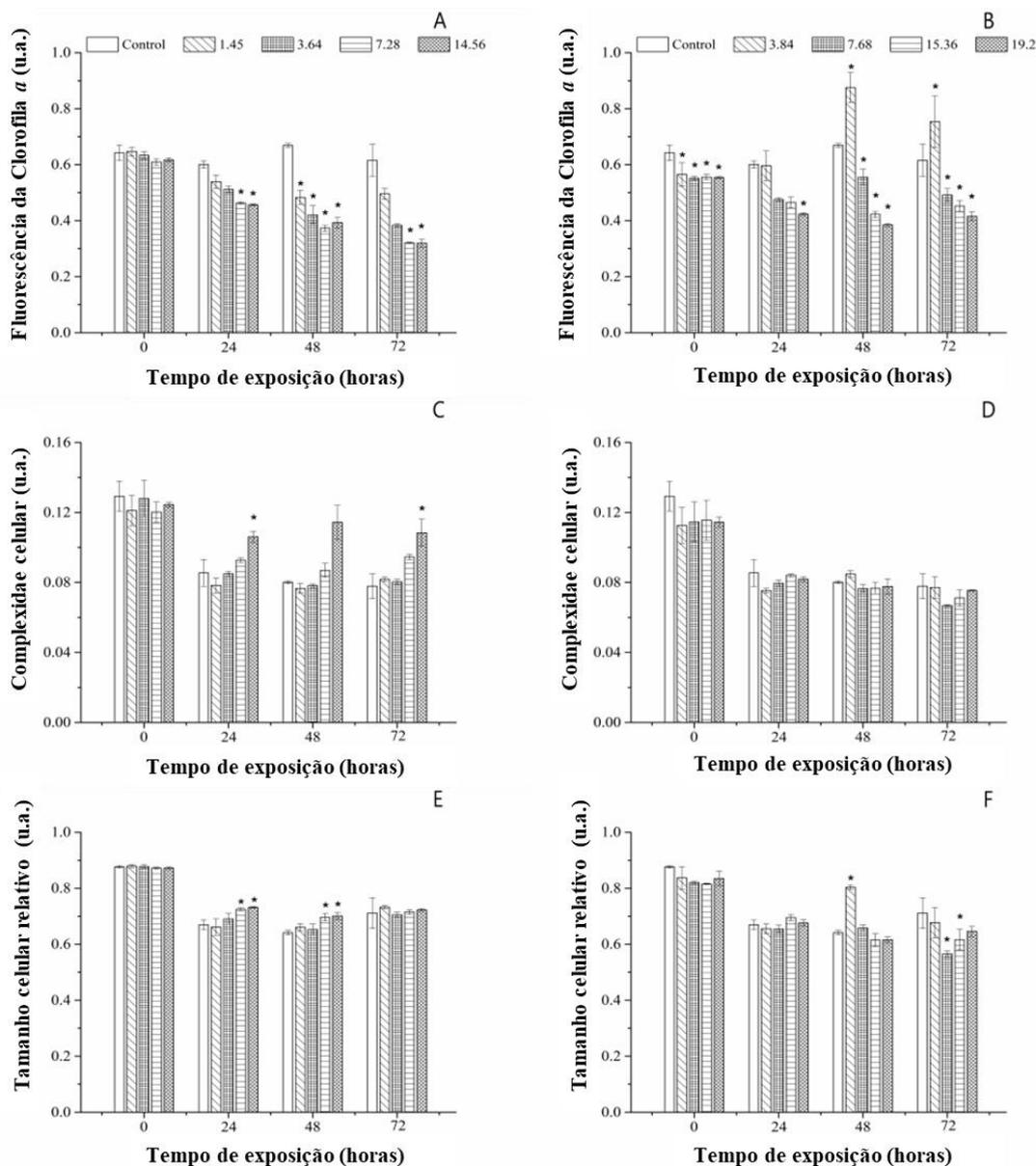


Fig.2: Fluorescência celular média da Clo *a* (FL3-H relativo) (média \pm DP), complexidade celular (SSC-H relativo) (média \pm DP) e tamanho celular relativo (FSC-H relativo) (média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 72 hrs de exposição ao manganês (A, C, E) e ao cromo (B, D, F). As concentrações dos metais estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferença significativa dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

A análise por citometria de fluxo da complexidade celular (ou granularidade) pode indicar acúmulo do metal internalizado pela célula da alga (Alho et al., 2020), seja pela formação de vacúolos ou vesículas. Este é um mecanismo agal para lidar com a

presença de metais pesados, reduzindo ou prevenindo seus efeitos tóxicos (Juarez et al., 2008). O Mn levou ao aumento da complexidade celular na concentração mais alta (14,56 μM) após 72 hrs de exposição (Fig. 2C) e o Cr não induziu alterações neste parâmetro ao longo de todo o experimento (Fig. 2D). Com base nisso, sugerimos que a *R. subcapitata* apresentou esse mecanismo de proteção para lidar com altas concentrações de Mn. No caso da exposição ao Cr, provavelmente não ocorreu internalização de metal, como já reportado para *C. kessleri* exposta a altas concentrações de Cr (até 4000 μM) (Juarez et al., 2008). Isso pode indicar a presença de outros mecanismos de proteção, como por exemplo, adsorção extracelular, conforme descrito para *C. kessleri* (Juarez et al., 2008).

O tamanho celular relativo da *R. subcapitata* aumentou apenas nas concentrações mais altas de Mn (7,28 e 14,56 μM , teste de Dunnett, $p < 0,05$) em 24 e 48 hrs de tratamento (Fig. 2E), e em 3,84 μM de Cr em 48 hrs exposição (Fig. 2F). Não foram observadas alterações no tratamento com Mn em 72 hrs de exposição, mas o Cr causou uma redução do tamanho das células das algas em 7,68 e 15,36 μM após 72 hrs de experimento. Um aumento no tamanho da célula durante estresse por metal pode indicar comprometimento do processo de divisão celular (Gebara et al., 2020). Em nosso estudo, as pequenas mudanças e a aparente recuperação no tamanho relativo das células durante a exposição ao Mn, após 72 hrs de experimento, podem indicar que as células das algas foram capazes de lidar com possíveis danos causados pelo metal no processo de divisão celular.

Houve aumento na produção de ROS nas células da microalga *R. subcapitata* em 3,64 e 7,28 μM de Mn em 48 e 72 hrs, quando comparado ao grupo controle (Fig. 3A, teste de Dunnett, $p < 0,05$). Considerando que esses aumentos foram menores em 72 hrs em comparação com 48 hrs para essas mesmas concentrações, sugerimos que os mecanismos antioxidantes da alga (Carfagna et al., 2013) foram ativados, sendo capazes de reduzir o teor de ROS intracelular. Todas as concentrações de Mn em 24 hrs e as concentrações de 1,45 e 14,56 μM em 72 hrs não induziram alterações na produção de ROS. Em 0 hrs, as algas expostas a 3,64 μM deste metal apresentaram menor produção de ROS do que as células do controle (teste de Dunnett, $p < 0,05$). Os dados brutos da produção de ROS pelas algas expostas ao Mn e Cr entre 0 e 72 hrs estão apresentados na Tabela S9 (Material suplementar).

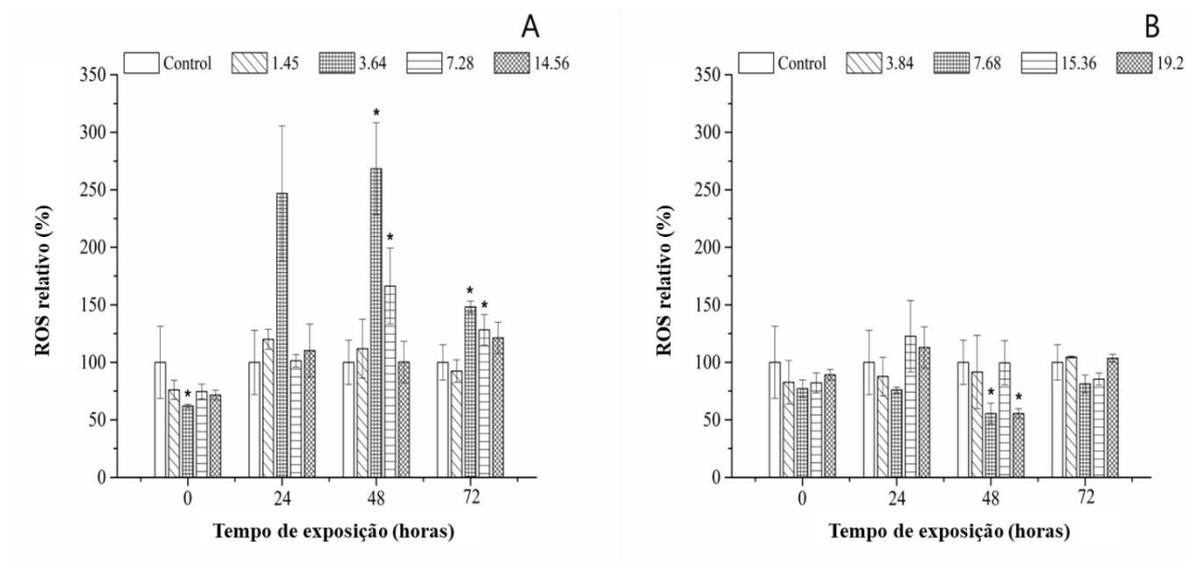


Fig. 3: Espécies reativas de oxigênio (ROS) (média \pm DP) produzidas por *Raphidocelis subcapitata* entre 0 a 72 hrs de exposição ao manganês (A) e ao cromo (B). As concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferenças significativas quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

O Cr (VI) tem um forte potencial oxidativo (Kotás e Stasicka, 2000), pois é reduzido a Cr (III) quando entra na célula, formando radicais livres e gerando ROS (Toranzo et al., 2020). Como a forma de Cr utilizada em nosso estudo foi a menos tóxica (Cr III), essa redução de Cr (VI) para Cr (III) não ocorreu. Isso pode explicar o fato de que não houve aumento na produção de ROS nas células da *R. subcapitata* durante as 72 hrs de exposição, embora em 48 hrs as concentrações de 7,68 e 19,2 μM tenham diminuído os níveis intracelulares de ROS, quando comparados ao grupo controle (Fig. 3B, teste de Dunnett, $p < 0,05$). Esses resultados contrastam com os encontrados por Kováčik et al. (2015), onde a alga *Scenedesmus quadricauda* inesperadamente produziu mais ROS em resposta à exposição ao Cr (III) do que ao Cr (VI). Este resultado foi provavelmente devido às condições de ensaio utilizadas pelos autores, como o pH que usaram no meio de cultivo (pH 6,5), pois na solução circunneutra o Cr (III) já foi reportado como sendo de 5 a 10 vezes mais tóxico para alga verde do que Cr (VI) (Vignati et al., 2010). De maneira geral, o estresse causado por metais pesados induz um aumento de ROS nas células de algas, como reportado por Alho et al. (2019) e Gebara et al. (2020), ao exporem *R. subcapitata* a Cd e Pb e a Zn e Al, respectivamente. Nos estudos desses autores, o ROS desempenhou um papel

importante na inibição do crescimento de algas como resultado da exposição aos metais. Apesar disso, nossos resultados indicam que a produção de ROS não foi a principal resposta da *R. subcapitata* à toxicidade do Mn e do Cr. Embora o Cr na forma trivalente seja conhecido por ser menos tóxico que o Cr (VI), quando em concentrações significativas, o Cr (III) pode induzir efeitos adversos (Kotás et al., 2000), como a redução da TRC e da fluorescência da Clo *a* da microalga observadas em nosso estudo, devido à sua alta capacidade de coordenar vários compostos orgânicos, resultando na inibição de alguns sistemas metaloenzimáticos (Kotás et al., 2000).

Em resumo, os impactos negativos do Mn e do Cr no crescimento algal podem estar relacionados à diminuição da síntese de Clo *a*, uma vez que a fluorescência celular média de Clo *a* foi o parâmetro mais afetado por ambos os metais a nível celular. A produção reduzida desse pigmento pode ter consequências para o desempenho fotossintético da alga. No entanto, investigações aprofundadas usando parâmetros fotossintéticos específicos seriam necessárias para confirmar isso. Cátions metálicos, como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Cu^{2+} , são conhecidos por terem a capacidade de substituir o Mg do átomo central da molécula de Clo, resultando em um processo fotossintético prejudicado (Baumann et al., 2009). Isso explica por que o Mn reduziu a fluorescência média de Clo *a* da *R. subcapitata*, especialmente considerando que a maior parte do metal adicionado dissociou-se como Mn^{2+} (96,8%, Tabela S3, Material suplementar). Além disso, íons de Cr(III) podem causar modificação da DNA polimerase e outras atividades enzimáticas pelo deslocamento do Mg (Cervantes et al., 2001). Em *Ninphaea alba* exposta ao Cr, o teor reduzido de Clo *a* foi atribuído à inibição da atividade da enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) por este metal. A ALAD é uma enzima envolvida na regulação da biossíntese de Clo, e o Cr pode reduzir sua atividade deslocando o Mg no sítio ativo da enzima (Vajpayee et al., 2000). Portanto, podemos supor que a síntese de Clo *a* da microalga foi o primeiro alvo afetado pela toxicidade do Mn e do Cr, com a inibição do crescimento como possível consequência da redução da produção de pigmento fotossintético.

3.3. Análise das curvas SSD

A curva SSD (Fig. 4) mostrou que a alga *R. subcapitata* é altamente sensível aos compostos testados neste estudo e é a espécie mais sensível à exposição ao Mn. Em

relação ao Mn, a *R. subcapitata* foi mais sensível que outros organismos autotróficos, como as espécies de algas *Scenedesmus quadricauda*, *Nitzschia closterium* e *Chlorella* sp., e a macrófita *Lemna aequinoctialis* (Fig. 4A; Tabela S5, Material complementar). Quando exposta ao Cr, a *R. subcapitata* apresentou maior sensibilidade que as espécies de algas *Stichococcus bacillaris*, *Dictyosphaerium chlorelloides*, *Scenedesmus quadricauda*, a cianobactéria *Synechococcus leopoliensis* e a macrófita *Lemna minor*. Apesar disso, a microalga foi menos sensível que outras quatro espécies de algas, alguns invertebrados (por exemplo, *Pseudosida ramosa*, *Daphnia magna*, *Anodonta imbecilis*) e o peixe *Salmo gairdneri* (Fig. 4B; Tabela S6, Material suplementar). Os valores médios e seus intervalos de confiança de 95% da HC₅ e HC₅₀ para o Mn foram 0,58 (0,10 – 1,70) e 13,05 (5,43 – 31,33) mg Mn L⁻¹, respectivamente, o que indica que a *R. subcapitata* não estaria potencialmente protegida. A USEPA (2004) estabeleceu um padrão de 0,05 mg Mn L⁻¹ por motivos estéticos (cor, coloração e sabor). A recomendação do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente; Brasil, 2005) e da Health Canada (2016) para níveis aceitáveis de Mn na água é de 0,1 mg L⁻¹ de Mn total, o que está próximo da IC_{50-72 hrs} que encontramos para esta espécie de alga (0,22 ± 0,02 mg Mn L⁻¹). Os valores médios e seus intervalos de confiança de 95% da HC₅ e HC₅₀ para o Cr foram, respectivamente, 0,04 (0,008 – 0,13) e 3,79 (1,58 – 9,11) mg Cr L⁻¹, o que significa que a microalga *R. subcapitata* estaria protegida apenas em relação a HC₅, não ao HC₅₀ (IC₅₀ = 0,85 mg Cr L⁻¹). Para o Cr total, a USEPA (2003) estabeleceu um nível máximo de 0,100 mg Cr L⁻¹ na água potável. Em contrapartida, a recomendação do CONAMA (Brasil, 2005) e da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003) para níveis aceitáveis é de 0,05 mg L⁻¹, inferior a IC_{50-72hrs} para *R. subcapitata*, o que indica que as recomendações para Cr protegeria esta espécie de alga.

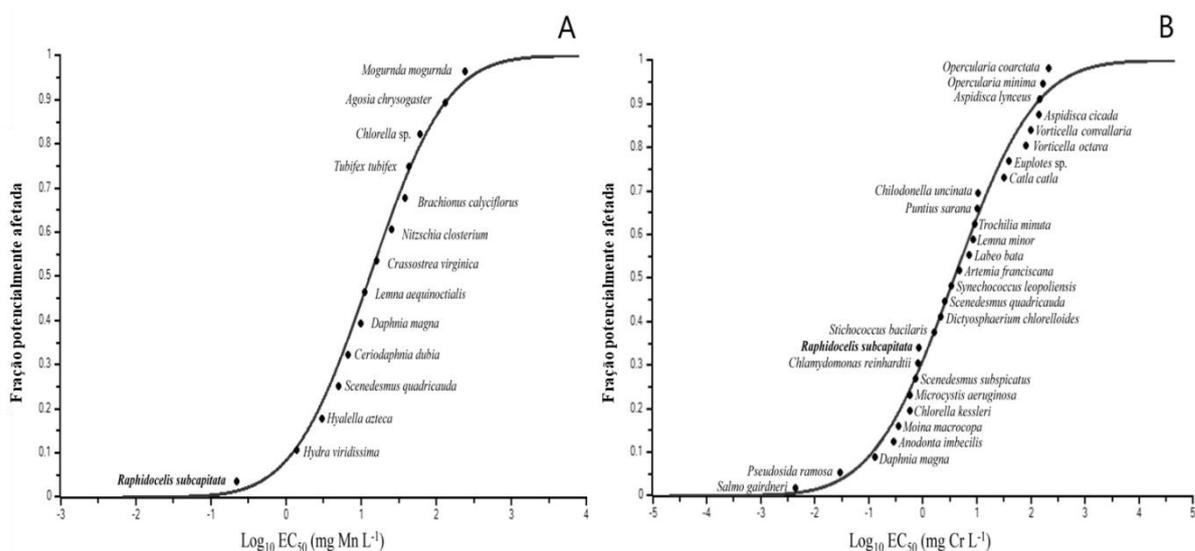


Fig. 4: Distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) baseada em valores de $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}/\text{LC}_{50}$ (mg metal L^{-1}) de organismos de água doce expostos ao manganês (A) e ao cromo (B). Os dados foram obtidos da literatura (Tabelas S2 e S3, material suplementar) e os resultados para a *Raphidocelis subcapitata* (presente estudo) estão apresentados em negrito.

Levando-se em conta que as microalgas estão na base das cadeias alimentares aquáticas, qualquer impacto em sua população pode levar à consequências em níveis tróficos superiores, como por exemplo, os resultados reportados por Rocha et al. (2016), que observaram redução da produção secundária e alterações em vários parâmetros do ciclo de vida de *Daphnia laevis* quando alimentada com *R. subcapitata* contaminada com cobre. Portanto, é de grande importância proteger as microalgas ao se determinar as concentrações-limite seguras de Mn nas diretrizes-padrão para critérios de qualidade da água.

3.4. Toxicidade dos metais combinados

Os resultados da exposição das microalgas à mistura binária de Mn e Cr foram analisados apenas em termos de TRC, pois os parâmetros morfológicos e os parâmetros de nível intracelular não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (dados não apresentados). Neste estudo, ambos os modelos de referência, adição de concentração (AC) e ação independente (AI), foram utilizados para analisar

os resultados obtidos da exposição de *R. subcapitata* à mistura de Mn e Cr. Esses modelos pressupõem não interação entre os produtos químicos e são usados para descrever a toxicidade combinada com base no modo de ação (MoA) de cada produto químico em sua forma isolada. AC assume que os compostos possuem o mesmo MoA, atuando sobre o mesmo alvo biológico, contribuindo para uma resposta comum proporcional às suas respectivas toxicidades isoladas (Loureiro et al., 2010; Mansano et al., 2017). O modelo de AI assume que os produtos químicos têm MoA diferentes, e seus efeitos são, portanto, independentes uns dos outros, e os efeitos combinados são calculados multiplicando as probabilidades das respostas (Loureiro et al., 2010; Mansano et al., 2017). Quando o MoA dos produtos químicos é desconhecido ou não está bem estabelecido, tanto o modelo de AC e AI são usados para descrever os dados, e aquele que melhor se ajusta aos dados é escolhido em detrimento do outro (Pavlaki et al., 2011; Mansano et al., 2017).

As misturas de metais podem induzir efeitos de maior ou menor intensidade do que os valores previstos pelos modelos ao somar as respostas biológicas de metais isolados (Liu et al., 2017). Segundo Jonker et al., (2005), pode haver quatro padrões complexos pelos quais os dados observados se desviam dos modelos de referência: nenhum desvio, sinergismo ou antagonismo (S/A - indicando, respectivamente, efeitos mais severos e menos severos do que os calculados pelo Modelos AC e AI), desvio dependente do nível de dose (DL - quando há um nível de dose baixo ou alto da mistura) e desvio dependente da razão de dose (DR - onde os padrões diferem de acordo com a composição da mistura) (Loureiro et al., 2010; Liu et al., 2017).

Com base nos valores obtidos, o modelo de AI foi o que melhor se ajustou aos dados (Tabela 1), embora ambos os modelos tenham sido estatisticamente significativos. Os dados ajustados ao modelo AC produziram um valor de SS (soma dos quadrados dos resíduos) de 0,57 ($p = 2,15 \times 10^{-6}$, $r^2 = 0,78$) (Tabela S4, Material suplementar). Ao adicionar o parâmetro “a”, a SS foi o mesmo e não foi estatisticamente significativo (SS = 0,57, $p > 0,05$, $r^2 = 0,78$). A adição dos parâmetros “b_{DR}” e “b_{DL}” levou a um valor de SS menor (SS = 0,52 e 0,56, respectivamente), mas também não significativo estatisticamente ($p > 0,05$, $r^2 = 0,79$ e 0,78, respectivamente) (Fig. S2, Material suplementar). Os mesmos passos foram seguidos para o modelo AI, que atingiu uma SS de 0,52 ($p < 8,88 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0,80$). Ao estender o modelo com parâmetro “a” (para verificar sinergismo ou antagonismo), a SS reduziu para 0,50, mas

não obteve melhora no ajuste ($p > 0,05$, $r^2 = 0,80$), bem como para a adição dos parâmetros “ b_{DR} ” e “ b_{DL} ” ($p > 0,05$, $r^2 = 0,82$ e $0,80$, respectivamente). Portanto, com base nos resultados discutidos acima e, no isoblograma da mistura (Fig. 5) com formas lineares, indicando a não interatividade dos efeitos da mistura, o modelo de AI teve o melhor ajuste e foi o melhor modelo para descrever os resultados obtidos, por gerar os menores valores de SS e de p , explicando 80% da variação dos dados. A variabilidade dos dados observados *versus* os dados de TRC modelados obtidos dos modelos de AI e AC estão apresentados na Fig. S3 (Material suplementar). Em resumo, ao expor a *R. subcapitata* ao Mn e ao Cr, verificamos que os resultados seguiram os modelos de referência sem funções de desvio. Portanto, os compostos não interagiram, apresentando efeitos aditivos na mistura.

Tabela 1: Resumo dos parâmetros e testes de ajuste do modelo de referência Ação Independente, aplicado às taxas relativas de crescimento da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta a mistura de manganês (Mn) e cromo (Cr) por 72 hrs.

	Ação Independente			
	AI	S/A	DR	DL
Max	1,25	1,26	1,24	1,27
β Mn	0,49	0,45	0,6	0,53
β Cr	3,11	3	2,82	3,17
IC ₅₀ para Mn	3,74	3,02	3,24	3,18
IC ₅₀ para Cr	17,1	16,3	17	15,78
a	-	0,61	-2,34	-1
$b_{DR/DL}$	-	-	4,78	2,48
SS	0,52	0,5	0,46	0,49
r^2	0,8	0,8	0,82	0,8
χ^2 ou F test	20,09	0,76	2,9	1,15
Df	-	1	2	2

$p(x^2/F)$ $8,88 \times 10^{-7}$ $>0,05$ $>0,05$ $>0,05$

Max = valor máximo de resposta, β = inclinação da curva de resposta dos compostos isolados, IC_{50} = concentração mediana de inibição de crescimento; a e $b_{DR/DL}$ = parâmetros da função; SS = soma dos quadrados dos resíduos; r^2 = coeficiente de regressão; teste x^2 ou F = estatística do teste; Df = graus de liberdade; $p(x^2/F)$ = nível de significância do teste estatístico. Os valores foram obtidos pela ferramenta MIXTOX (Jonker et al., 2005).

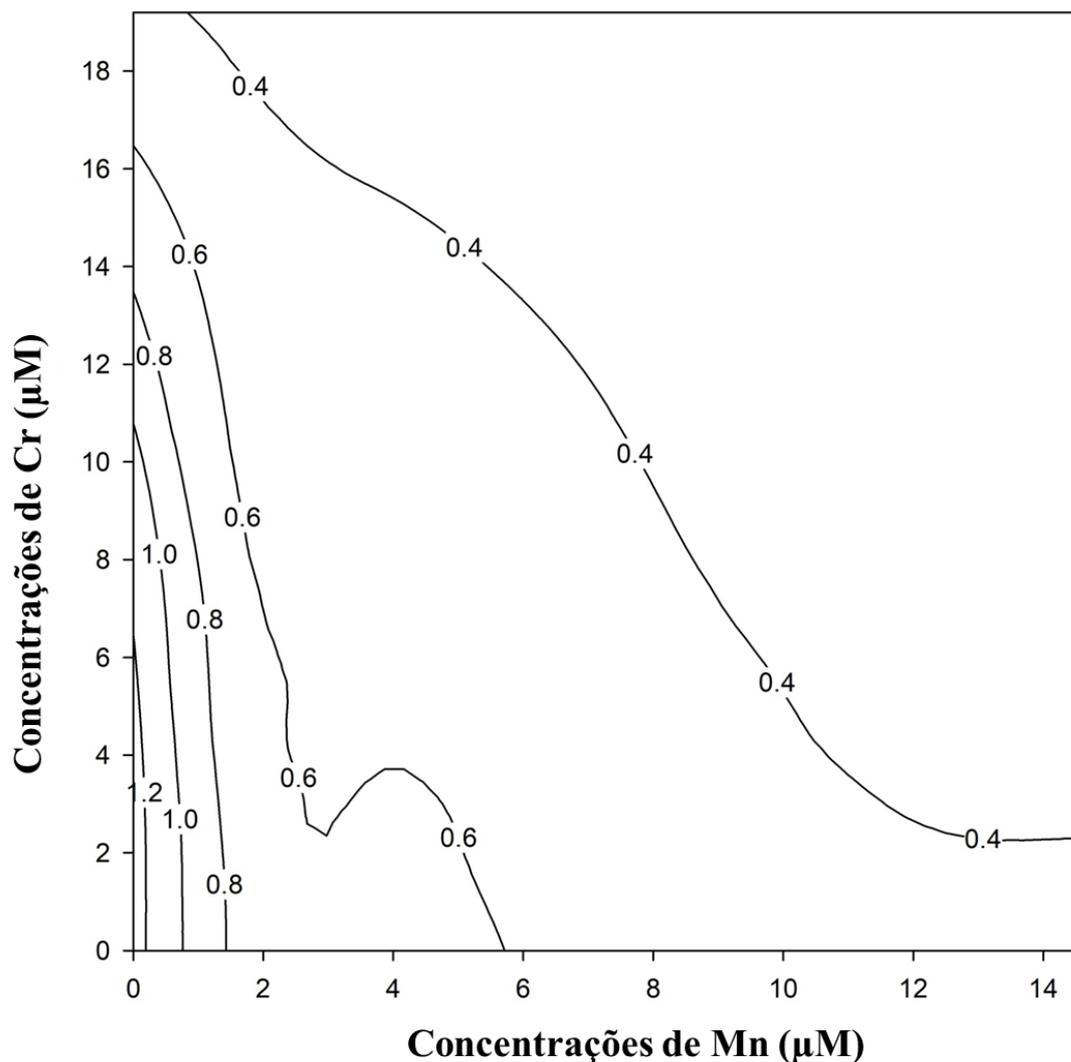


Fig.5: Isobolograma dos efeitos das misturas dos metais na taxa relativa de crescimento da microalga *Raphidocelis subcapitata*, seguindo o modelo de referência de Ação

Independente. Linhas lineares indicam ausência de interação, formas côncavas demonstram sinergismo e formas convexas representam antagonismos (Alloatti et al., 2013).

Como mencionado anteriormente, o modelo de AI assume que os produtos químicos têm um modo de ação diferente (MoA) (Loureiro et al., 2010; Mansano et al., 2017). Isso é reforçado por nossos resultados de efeitos de toxicidade do Mn e do Cr isolados. O Mn provavelmente levou a uma redução da síntese de Clo *a* substituindo o Mg do átomo central da molécula de Clo *a*, como mencionado anteriormente. Além disso, o Cr pode ter causado uma redução na produção desse pigmento através do deslocamento do Mg do sítio ativo da enzima ALAD (conforme descrito para *N. alba*, Vajpayee et al., 2000). Apesar de possuir diferentes MoA, a exposição aos dois metais de forma isolada levou à mesma resposta da alga: redução da síntese de Clo *a*, o que possivelmente impactou o crescimento algal.

Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Nys et al. (2018). Esses autores conduziram uma meta-análise dos efeitos de toxicidade crônica de misturas de metais em organismos de água doce e concluíram que, em geral, a toxicidade crônica das misturas de metais é prevista com mais precisão com AI em comparação com AC. Além disso, com base em seus resultados, os efeitos da mistura de metais não são interativos em 69% (AI) e 44% (AC) dos experimentos.

4. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que tanto o Mn quanto o Cr afetam negativamente o crescimento da microalga *R. subcapitata* em concentrações ambientalmente relevantes. Os resultados de IC_{50-72 hrs} e das curvas SSD destacam a grande sensibilidade da microalga aos metais testados. Ambos os metais reduziram a fluorescência celular média da Clo *a*, e a redução no crescimento foi possivelmente consequência da redução da produção de Clo *a*, o que pode afetar o processo fotossintético. Considerando que o Cr (III) é conhecido por ter baixa permeabilidade de membrana, e que o Mn levou a efeitos mais intensos na fluorescência celular média das algas, o Mn foi o metal mais

tóxico para a Chlorophyceae em nosso estudo. Além disso, nosso estudo fornece um banco de dados de toxicidade de Mn e Cr para vários organismos de água doce de diferentes níveis tróficos. A curva SSD para o Mn revelou que a *R. subcapitata* foi o organismo mais sensível a este metal. As concentrações perigosas para 5% (HC₅) e para 50% (HC₅₀) dos organismos em relação aos efeitos tóxicos do Mn e do Cr foram derivadas e os dados obtidos podem ser usados por agências reguladoras para desenvolver padrões apropriados para critérios de qualidade da água, e podem ajudar futuras diretrizes governamentais para determinar concentrações-limite seguras de Mn e Cr em corpos de água doce. Os dados do teste de toxicidade da mistura de Mn e Cr não se desviaram dos modelos de referência (AC e AI), indicando que esses metais não interagem e apresentam, portanto, efeitos de aditividade na mistura.

REFERÊNCIAS

- Aharchaou, I., Rosabal, M., Liu, F., Battaglia, E., Vignati, D. A. L., 2017. Bioaccumulation and subcellular partitioning of Cr(III) and Cr(VI) in the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 182, 49-57.
- Aldenberg, T., Jaworska, J. S., 2000. Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected by normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 1 -18.
- Alho, L. O. G., Gebara, R. C., Paina, K. A., Sarmiento, H., Melão, M. G. G., 2019. Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 950-959.
- Alloatti, A., Tripodi, K. E., Uttaro, A. D., 2013. Synergistic effect of inhibitors of fatty acid desaturases on *Trypanosoma parasites*. *Parasitol. Res.* 112, 3289-3294.
- Bao, V. W., Leung, K. M., Qiu, J. W., Lam, M. H., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollt. Bull.* 62, 1147 – 1151.
- Baumann, H. A., Morrison, L., Stengel, D. B., 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM—chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1063-1075.
- Bliss, C. I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-615.
- Brazil – Ministry of the Environment, 2005. National Environmental Council – CONAMA. Resolution n. 357/2005. March 17h. Brasília, DF, 7 pp.
- Brazil – National Mining Agency, 2019. Brazilian Mineral Yearbook – main metallic commodities. Brasília, DF, 35 pp. Available at: https://www.gov.br/anm/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/anuario-mineral/anuario-mineral-brasileiro/AMB2019_anobase2018_FINAL.pdf
- Calabrese, A., Collier, R. S., Nelson, D. A., MacInnes, J. R., 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 18, 162–166.
- Calabrese, E.J, Mattson, M.P., 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *Aging Mech. Dis.* 3, 13.

- Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., Vona, V., 2013. Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). SpringerPlus 2, 147.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol. Rev. 25 (3), 335-347.
- Couillard, Y., 1989. Acute Toxicity of Six Metals to the Rotifer *Brachionus calyciflorus*, with Comparisons to Other Freshwater Organisms. Toxicol. Assess. 4, 451–462.
- De Schampelaere, K., Janssen, C. R., 2004. Effects of chronic dietary copper exposure on growth and reproduction on *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 23 (8), 2038-2047.
- 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.
- Elystia, S., Edward, H. S., Putri, A. E., 2020. Removal of Chromium (VI) and Chromium (III) by using *Chlorella* sp. Immobilized at Electroplating Wastewater. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. **515** 012078.
- Fargašová, A., Bumbálová, A., Havránek, E., 1999. Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , V^{5+}) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. Chemosphere 38 (5), 1165-1173.
- 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. I., 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.
- 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.
- Harford, A. J., Mooney, T. J., Trenfield, M. A., Van Dam, R. A., 2015. Manganese toxicity to tropical freshwater species in low hardness water. Environ. Toxicol. Chem. 34 (12), 2856 – 2863.

- He, X., Li, P., 2020. Surface Water Pollution in the Middle Chinese Loess Plateau with Special Focus on Hexavalent Chromium (Cr⁶⁺): Occurrence, Sources and Health Risks. *Expo. Health* 12, 385-401.
- Health Canada, 2016. Manganese in drinking water. Document for Public Consultation. Ottawa, Canada. Available at <https://www.canada.ca/content/dam/canada/health-canada/migration/healthy-canadians/health-system-systeme-sante/consultations/manganese/alt/manganese-eng.pdf>.
- 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.
- Hossain, M. S., Ahmed, M. K., Liyana, E., Hossain, M. S., Jolly, Y. N., Kabir, M. J., Akter, S., Rahman, M. S., 2021. A Case Study on Metal Contamination in Water and Sediment near a Coal Thermal Power Plant on the Eastern Coast of Bangladesh. *Environments* 2021, 8, 108. DOI: <https://doi.org/10.3390/environments8100108>
- Janson, C. A., Cleland, W. W., 1974. The specificity of chromium nucleotides as inhibitors of selected kinases. *J. Biol. Chem.* 249, 2572-2574.
- 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. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701-2713.
- Juarez, A. B., Barsanti, L., Passareli, V., Evangelista, V., Vesentini, N., Conforti, V., Gualtieri, P., 2008. *In vivo* microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina unicocca* and *Chlorella kessleri*. *J. Environ. Monit.* 10, 1313-1318.
- Kakoi, B., Kakuli, J.W., Ndiba, P., Thiong'o, G., 2016. Banana pith as a natural coagulant for polluted river water, *Ecol. Eng.* 95, 699–705.
- Keller, A. E., Zam, S. G., 1991. The acute toxicity of selected metals to the freshwater mussel, *Anodonta imbecilis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 539-546.
- Knauer, K., Jabusch, T., Sigg, L., 1999. Manganese uptake and Mn (II) oxidation by the alga *Scenedesmus subspicatus*. *Aquat. Sci.* 61, 44-58.

- Kotás, J., Stasicka, Z., 2000. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* 107, 263-283.
- Kováčik, J., Babula, P., Hedbavny, J., Kryštofová, O., Provazník, I., 2015. Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object. *Chemosphere* 120, 20-30.
- Kruse, N. D., Vidal, R. A., Trezzi, M. M., 2006. Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. *Planta daninha* 24 (3), 579-587.
- Lasier, P. J., Winger, P. V., Bogenrieder, K. J., 2000. Toxicity of Manganese to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyaella azteca*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 298-304.
- Lewis, M., 1978. Acute toxicity of copper, zinc and manganese in single and mixed salt solutions to juvenile longfin dace, *Agosia chrysogaster*. *J. Fish Biol.* 13, 695-700.
- Liu, Y., Vijver, M. G., Pan, B., Peijnenburg, W. J. G. M., 2017. Toxicity models of metal mixtures established on the basis of “additivity” and “interactions”. *Front. Environ. Sci. Eng.* 11 (2), 10.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Combined effects I announcement-implements to the problem. *Naunyn-Schmiedebergs. Achr. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313-326.
- Lopes, N. P., Freitas, R. P. d., Filho, R. C. R., 2019. How many more brumadinhos and marianas will we be faced with yet? *J. Braz. Chem. Soc.* 30, 681-682.
- Loureiro, S., Svendsen, C., Ferreira, A. L. G., Pinheiro, C., 2010. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (8), 1716-1726.
- Madoni, P., Davoli, D., Gorbi, G., Vescovi, L., 1996. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. *Wat. Res.* 30 (1), 135-141.
- Mansano, A. S., Moreira, R. A., Dornfeld, H. C., Freitas, E. C., Vieira, E. V., Sarmiento, H., Rocha, O., Selegim, M. H.R., 2017. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 312-321.

- Martínez-Jerónimo, F., 2006. Effect of culture conditions and mother's age on the sensitivity of *Daphnia magna* Straus 1820 (Cladocera) neonates to hexavalent chromium. *Ecotoxicology* 15, 259-266.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A. G., Mora, M. L., Alberdi, M., 2010. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10 (4), 470-481.
- Nalewajko, C., O'Mahony, M. A., 1989. Photosynthesis of algal cultures and phytoplankton following an acid pH shock. *Journal of Phycology* 25, 319-325.
- Nys, C., Van Regenmortel, T., Janssen, C. R., Oorts, K., Smolders, E., De Schampelaere, K. A. C., 2018. A framework for ecological risk assessment of metal mixtures in aquatic systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 37 (3), 623-642.
- OECD – Organization for Economic Co-operation and Development, 2002. OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria. Growth Inhibition Test, 21 pp.
- Oliveira, L. F., Cabral, M. T., Vieira, C. E. D., Antoniazzi, M. H., Risso, W. E., Martinez, C. B. R., 2016. Metals bioaccumulation and biomarkers responses in the Neotropical freshwater clam *Anodontes trapesialis*: Implications for monitoring coal mining areas. *Sci. Total Environ.* 15, 983-991.
- Pavlaki, M. D., Pereira, R., Loureiro, S., Soares, A. M. V. M., 2011. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 99-110.
- Rand, G., 1995. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Taylor & Francis, Washington, DC.
- Rocha, G. S., Tonietto, A. E., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., 2016. Effect of copper contaminated food on the life cycle and secondary production of *Daphnia laevis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 235-242.
- Rodgher, S., Espíndola, E. L. G., Simões, F. C. F., Tonietto, A. E., 2012. Cadmium and Chromium Toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Microcystis aeruginosa*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55 (1), 161-169.
- Rodríguez, M. C., Barsani, L., Passareli, V., Evangelista, V., Conforti, V., Gualtieri, P., 2007. Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Res.* 105, 234-239.

- Rojíčková-Padrťová, R., Maršálek, B., 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere* 38 (14), 3329-3338.
- Ryall, K. A., Tan, A., 2015. Systems biology approaches for advancing the discovery of effective drug combinations. *J. Cheminform.* 7 (7), 1-15.
- Sánchez-Fortún, S., López-Rodas, V., Navarro, M., Marvá, F., D'ors, A., Rouco, M., Haigh-Florez, D., Costas, E., 2009. Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (9), 1901-1905.
- Sanyal, T., Kaviraj, A., Saha, S., 2017. Toxicity and bioaccumulation of chromium in some freshwater fish. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 23 (7), 1655-1667.
- 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. *Freshw. Biol.* 53, 756-771.
- Sharma, N., Sodhi, K. K., Kumar, M., Singh, D. K., 2020. Heavy metal pollution: Insights into chromium eco-toxicity and recent advancement in its remediation. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.*, 100388. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100388>
- Silva, J. C., Echeveste, P., Lombardi, A. T., 2018. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161, 57-63.
- Singh, S. P., Kashyap, A. K., 1978. Manganese toxicity and mutagenesis in two blue-green algae. *Environ. Exp. Bot.* 18, 47-53.
- Smythers, A. L., Perry, N. L., Kolling, D. R. J., 2019. *Chlorella vulgaris* bioaccumulates excess manganese up to 55 x under photomixotrophic conditions. *Algal Res.*, 101641. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101641>
- Švec, P., Kováčik, J., Hedbavný, J., Babula, P., Rotková, G., Klejdus, B., 2016. Impact of anions, cations, and pH on manganese accumulation and toxicity in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Water Air Soil Pollut.* 227, 161.
- Statsoft. 2004. Statistica, v. 07. www.statsoft.com.
- Systat, 2008. Systat Software, Incorporation SigmaPlot for Windows version 11.0.

Toranzo, R., Ferraro, G., Beligni, M. V., Perez, G. L., Castiglioni, D., Pasquevich, D., Bagnato, C., 2020. Natural and acquired mechanisms of tolerance to chromium in a *Scenedesmus dimorphus* strain. *Algal Res.*, 102100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102100>.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2002. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms* (Washington, DC).

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2003. National Primary Drinking Water Regulations 40CFR141.62. U.S. EPA, Washington, DC. Available at: http://edocket.access.gpo.gov/cfr_2003/julqtr/40cfr141.62.htm

USEPA – United States Environmental Protection Agency, 2004. Drinking water health advisory for manganese. Report 822R040032004 (Washington, DC).

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2012. *Ecological Effects Test Guidelines, Algal Toxicity*. Washington D.C., USA, 26 pp.

Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Ali, M. B., Singh, S. N., 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* 41, 1075-1082.

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 <http://rivm.openrepository.com/handle/10029/256981>.

Vignati, D. A. L., Dominik, J., Beye, M. L., Pettine, M., Ferrari, B. J. D., 2010. Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: a paradigm to revise? *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 73, 743-749.

WHO - World Health Organization, 2003. *Chromium in Drinking-water, Guidelines for Drinking-water Quality*.

MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 1

Tabela S1: medidas de pH dos testes de toxicidade com a microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Mn e ao Cr nas formas isolada e combinada.

Mn (μM)	Cr (μM)	pH	
		0 h	72 h
0,009 (Control)	0,00	7,01	8,34
1,45	0,00	7,02	8,26
3,64	0,00	6,93	7,92
7,28	0,00	6,93	7,61
14,56	0,00	7,02	7,61
0,00	3,84	7,01	8,28
0,00	7,68	7,09	8,36
0,00	15,36	7,10	8,12
0,00	19,20	7,10	7,96
1,45	3,84	7,04	7,81
1,45	7,68	6,99	7,28
1,45	15,36	7,06	7,14
1,45	19,20	6,95	7,01
3,64	3,84	6,98	7,88
3,64	7,68	7,02	7,81
3,64	15,36	7,00	7,47
3,64	19,20	6,91	7,43
7,28	3,84	6,98	7,80
7,28	7,68	6,98	7,59
7,28	15,36	7,07	7,17
7,28	19,20	6,97	7,19
14,56	3,84	6,96	7,55
14,56	7,68	7,01	7,45
14,56	15,36	6,95	7,27
14,56	19,20	7,04	7,41

Tabela S2: Concentrações nominais e medidas de manganês e cromo (mg L^{-1}) no controle (somente meio de cultivo, sem adição de metal extra), soluções-teste e soluções-estoque utilizadas nos experimentos com *Raphidocelis subcapitata*. Os tratamentos I1 a I4 referem-se às soluções-teste com Mn isolado (sem adição de Cr); Os tratamentos I5 a I 8 referem-se às soluções-teste com Cr isolado (sem adição extra de Mn); Os tratamentos M1 a M16 referem-se às soluções-teste com a mistura de Mn e Cr; C = grupo controle.

Treatmento	Concentrações de Mn (mg L^{-1})		Concentrações de Cr (mg L^{-1})	
	Nominal	Medida	Nominal	Medida
Controle	0,047 ^a	0,05 ± 0,000 ^a	-	-
I1	0,08	0,082 ± 0,000	-	-
I2	0,2	0,192 ± 0,001	-	-
I3	0,4	0,382 ± 0,000	-	-
I4	0,8	0,758 ± 0,000	-	-
I5	0,047	0,05 ± 0,000	0,2	0,174 ± 0,000
I6	0,047	0,05 ± 0,000	0,4	0,362 ± 0,001
I7	0,047	0,05 ± 0,000	0,8	0,730 ± 0,003
I8	0,047	0,05 ± 0,000	1	0,920 ± 0,000
M1	0,08	0,078 ± 0,000	0,2	0,174 ± 0,000
M2	0,08	0,074 ± 0,000	0,4	0,353 ± 0,001
M3	0,08	0,071 ± 0,000	0,8	0,724 ± 0,004
M4	0,08	0,072 ± 0,000	1	0,887 ± 0,001
M5	0,2	0,191 ± 0,000	0,2	0,174 ± 0,000
M6	0,2	0,179 ± 0,000	0,4	0,353 ± 0,002
M7	0,2	0,178 ± 0,000	0,8	0,700 ± 0,001
M8	0,2	0,181 ± 0,000	1	0,874 ± 0,005
M9	0,4	0,369 ± 0,000	0,2	0,173 ± 0,000
M10	0,4	0,365 ± 0,001	0,4	0,351 ± 0,001
M11	0,4	0,365 ± 0,000	0,8	0,705 ± 0,002
M12	0,4	0,363 ± 0,001	1	0,883 ± 0,006
M13	0,8	0,742 ± 0,002	0,2	0,176 ± 0,000
M14	0,8	0,733 ± 0,002	0,4	0,355 ± 0,002
M15	0,8	0,723 ± 0,002	0,8	0,712 ± 0,002
M16	0,8	0,720 ± 0,003	1	0,885 ± 0,008

Stock Solution	1000	1080,75 ± 0,002	1000	1033,21 ± 0,004
----------------	------	-----------------	------	-----------------

^a = manganês presente no meio de cultivo do grupo controle

Tabela S3: Especificação de manganês nas solução-teste, predita pelo software MINEQL+.

Mn total adicionado (μM)	Mn livre (Mn^{2+})		$\text{MnSO}_4(\text{aq})$	
	μM	%	μM	%
1,45	1,43	96,8	0,045	3,0
3,64	3,52	96,8	0,111	3,0
7,28	7,05	96,8	0,222	3,0
14,56	14,10	96,8	0,444	3,0

Tabela S4: Especificação de cromo nas solução-teste, predita pelo software MINEQL+.

Cr total adicionado (μM)	$\text{Cr}(\text{OH})_2^+$		$\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$		$\text{Cr}(\text{OH})_3(\text{aq})$	
	μM	%	μM	%	μM	%
3,84	3,42	89,0	0,28	7,30	0,13	3,40
7,68	6,84	89,0	0,56	7,30	0,26	3,40
15,36	13,70	89,0	1,12	7,30	0,52	3,40
19,20	17,10	89,0	1,40	7,30	0,65	3,40

Tabela S5: Dados de toxicidade do manganês para organismos aquáticos obtidos da literatura. Os dados para *Raphidocelis subcapitata* observados no presente estudo estão em negrito.

Grupo	Espécies	Endpoint/Tempo de exposição	Valor do endpoint (mg Mn L ⁻¹)	Referências
Algae	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	IC₅₀ 72hrs	0,22	Presente estudo
Cnidaria	<i>Hydra viridissima</i>	IC ₅₀ 96hrs	1,38	Harford et al., 2015
Crustacean	<i>Hyalella azteca</i>	LC ₅₀ 96hrs	3	Lasier et al., 2000
Alga	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	IC ₅₀ 12d	4,98	Fargašová, 1999
Crustáceo	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	LC ₅₀ 48hrs	6,7	Lasier et al., 2000
Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	LC ₅₀ 48hrs	9,8	Biesinger e Christensen, 1972
Macrófita	<i>Lemna aequinoctialis</i>	IC ₅₀ 96hrs	11	Harford et al., 2015
Ostra	<i>Crassostrea virginica</i>	LC ₅₀ 48hrs	15,97	Calabrese et al., 1973
Alga	<i>Nitzschia closterium</i>	EC ₅₀ 96hrs	25,65	Rosko e Rachlin, 1975
Rotifera	<i>Brachionus calyciflorus</i>	LC ₅₀ 24hrs	38,7	Couillard, 1989
Oligoqueta	<i>Tubifex tubifex</i>	IC ₅₀ 96hrs	42,7	Rathore e Khangarot, 2003
Alga	<i>Chlorella</i> sp.	IC ₅₀ 72hrs	60	Harford et al., 2015
Peixe	<i>Agosia chrysogaster</i>	LC ₅₀ 96hrs	130	Lewis, 1978
Peixe	<i>Mogurnda mogurnda</i>	LC ₅₀ 96hrs	240	Harford et al., 2015

Tabela S6: Dados de toxicidade do cromo para organismos aquáticos obtidos da literatura. Os dados para *Raphidocelis subcapitata* observados no presente estudo estão em negrito.

Grupo	Espécies	Endpoint/Tempo de exposição	Valor do endpoint (mg Cr L ⁻¹)	Referências
Peixe	<i>Salmo gairdneri</i>	LC ₅₀ 96h	0,0044	Stevens e Chapman, 1984
Crustáceo	<i>Pseudosida ramosa</i>	LC ₅₀ 48h	0,029	Freitas e Rocha, 2011
Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	LC ₅₀ 48h	0,13*	Kim et al., 2002; Martínez-Jerónimo, 2006
Molusco	<i>Anodonta imbecilis</i>	LC ₅₀ 48h	0,29	Keller e Zam, 1991
Crustáceo	<i>Moina macrocopa</i>	LC ₅₀ 48h	0,36	Wong, 1992
Alga	<i>Chlorella kessleri</i>	IC ₅₀ 72h	0,57	Rojícková-Padrtoová e Marsáler, 1999
Alga	<i>Microcystis aeruginosa</i>	IC ₅₀ 96h	0,57	Rodgher et al., 2012
Alga	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	IC ₅₀ 72h	0,74	Rojícková-Padrtoová e Marsáler, 1999
Alga	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	IC ₅₀ 72h	0,81	Rojícková-Padrtoová e Marsáler, 1999
Alga	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	IC₅₀ 72h	0,85	Presente estudo
Alga	<i>Stichococcus bacillaris</i>	IC ₅₀ 72h	1,64	Rojícková-Padrtoová e Marsáler, 1999
Alga	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	IC ₅₀ 72h	2,14*	Pereira et al., 2013; Sánchez-Fortún et al., 2009
Alga	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	IC ₅₀ 72h	2,52	Rojícková-Padrtoová e Marsáler, 1999
Cianobactérica	<i>Synechococcus leopoliensis</i>	IC ₅₀ 96h	3,31	Rojícková-Padrtoová e Marsáler, 1999
Crustáceo	<i>Artemia franciscana</i>	LC ₅₀ 24h	4,77	Hadjispyrov et al., 2001
Peixe	<i>Labeo bata</i>	LC ₅₀ 96h	7,3	Sanyal et al., 2017
Macrófita	<i>Lemna minor</i>	EC ₅₀ 7-day	8,5	Ince et al., 1999
Protozoário	<i>Trochilia minuta</i>	LC ₅₀ 24h	9,25	Madoni et al., 1996

Peixe	<i>Puntius sarana</i>	LC ₅₀ 96h	10,3	Sanyal et al., 2017
Protozoário	<i>Chilodonella uncinata</i>	LC ₅₀ 24h	10,6	Madoni et al., 1996
Peixe	<i>Catla catla</i>	LC ₅₀ 96h	31,6	Sanyal et al., 2017
Protozoário	<i>Euplotes</i> sp.	LC ₅₀ 24h	38,6	Madoni et al., 1996
Protozoário	<i>Vorticella octava</i>	LC ₅₀ 24h	80	Madoni et al., 1996
Protozoário	<i>Vorticella convallaria</i>	LC ₅₀ 24h	101	Madoni et al., 1996
Protozoário	<i>Aspidisca cicada</i>	LC ₅₀ 24h	138	Madoni et al., 1996
Protozoário	<i>Aspidisca lynceus</i>	LC ₅₀ 24h	145	Madoni et al., 1996
Protozoário	<i>Opercularia minima</i>	LC ₅₀ 24h	164	Madoni et al., 1996
Protozoário	<i>Opercularia coarctata</i>	LC ₅₀ 24h	211	Madoni et al., 1996

* Para espécies que possuíam mais de um dado de endpoint disponível na literatura, as médias geométricas foram calculadas.

Tabela S7: Taxa relativa de crescimento (TRC) de *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Mn e ao Cr.

Mn (μM)	Cr (μM)	TRC		
		24 hrs	48 hrs	72 hrs
0,009 (Controle)	0,00	$1,00 \pm 0,006$	$1,00 \pm 0,010$	$1,00 \pm 0,055$
1,45	0,00	$1,25 \pm 0,041$	$0,84 \pm 0,144$	$0,86 \pm 0,101$
3,64	0,00	$1,06 \pm 0,080$	$0,63 \pm 0,079$	$0,52 \pm 0,019$
7,28	0,00	$0,95 \pm 0,031$	$0,51 \pm 0,046$	$0,28 \pm 0,048$
14,56	0,00	$0,88 \pm 0,061$	$0,38 \pm 0,063$	$0,17 \pm 0,023$
0,009	3,84	$1,72 \pm 0,162$	$1,25 \pm 0,071$	$1,60 \pm 0,045$
0,009	7,68	$1,21 \pm 0,069$	$0,84 \pm 0,021$	$1,07 \pm 0,040$
0,009	15,36	$1,03 \pm 0,116$	$0,64 \pm 0,058$	$0,66 \pm 0,106$
0,009	19,20	$1,00 \pm 0,010$	$0,56 \pm 0,056$	$0,55 \pm 0,034$

Tabela S8: Fluorescência celular média da clorofila *a* (FL3-H relativo), complexidade celular (SSC-H relativo) e tamanho celular relativo (FSC-H relativo) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta a Mn e ao Cr.

Mn (μM)	Cr (μM)	Média da fluorescência da Clo <i>a</i>			
		0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
0,009 (Controle)	0,00	0,64 \pm 0,027	0,60 \pm 0,012	0,67 \pm 0,006	0,61 \pm 0,057
1,45	0,00	0,65 \pm 0,015	0,53 \pm 0,023	0,48 \pm 0,025	0,49 \pm 0,019
3,64	0,00	0,63 \pm 0,011	0,51 \pm 0,011	0,42 \pm 0,032	0,38 \pm 0,005
7,28	0,00	0,61 \pm 0,011	0,46 \pm 0,003	0,37 \pm 0,010	0,32 \pm 0,002
14,56	0,00	0,62 \pm 0,006	0,46 \pm 0,003	0,39 \pm 0,019	0,32 \pm 0,014
0,009	3,84	0,56 \pm 0,041	0,59 \pm 0,053	0,87 \pm 0,053	0,75 \pm 0,092
0,009	7,68	0,55 \pm 0,006	0,47 \pm 0,006	0,55 \pm 0,028	0,49 \pm 0,023
0,009	15,36	0,55 \pm 0,010	0,46 \pm 0,018	0,42 \pm 0,010	0,45 \pm 0,019
0,009	19,20	0,55 \pm 0,002	0,42 \pm 0,005	0,38 \pm 0,005	0,41 \pm 0,016
		Complexidade celular			
		0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
0,009 (Controle)	0,00	0,13 \pm 0,008	0,08 \pm 0,007	0,08 \pm 0,000	0,08 \pm 0,006
1,45	0,00	0,12 \pm 0,008	0,08 \pm 0,004	0,08 \pm 0,002	0,08 \pm 0,001
3,64	0,00	0,13 \pm 0,010	0,08 \pm 0,001	0,08 \pm 0,000	0,08 \pm 0,001
7,28	0,00	0,12 \pm 0,005	0,09 \pm 0,001	0,09 \pm 0,003	0,09 \pm 0,001
14,56	0,00	0,12 \pm 0,001	0,10 \pm 0,003	0,11 \pm 0,009	0,10 \pm 0,007
0,009	3,84	0,11 \pm 0,010	0,07 \pm 0,001	0,08 \pm 0,002	0,08 \pm 0,006
0,009	7,68	0,11 \pm 0,011	0,08 \pm 0,001	0,08 \pm 0,002	0,07 \pm 0,000
0,009	15,36	0,12 \pm 0,013	0,08 \pm 0,000	0,08 \pm 0,003	0,07 \pm 0,004
0,009	19,20	0,11 \pm 0,002	0,08 \pm 0,001	0,08 \pm 0,004	0,07 \pm 0,000
		Tamanho celular relativo			
		0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
0,009 (Controle)	0,00	0,88 \pm 0,004	0,67 \pm 0,017	0,64 \pm 0,007	0,71 \pm 0,055
1,45	0,00	0,88 \pm 0,005	0,66 \pm 0,029	0,66 \pm 0,012	0,73 \pm 0,005
3,64	0,00	0,88 \pm 0,005	0,69 \pm 0,019	0,65 \pm 0,019	0,70 \pm 0,009
7,28	0,00	0,87 \pm 0,003	0,72 \pm 0,004	0,70 \pm 0,013	0,71 \pm 0,008
14,56	0,00	0,87 \pm 0,005	0,73 \pm 0,002	0,70 \pm 0,012	0,72 \pm 0,005
0,009	3,84	0,83 \pm 0,040	0,65 \pm 0,018	0,80 \pm 0,008	0,68 \pm 0,054

0,009	7,68	$0,82 \pm 0,004$	$0,65 \pm 0,013$	$0,66 \pm 0,010$	$0,56 \pm 0,010$
0,009	15,36	$0,81 \pm 0,002$	$0,69 \pm 0,010$	$0,61 \pm 0,022$	$0,61 \pm 0,036$
0,009	19,20	$0,83 \pm 0,026$	$0,67 \pm 0,012$	$0,61 \pm 0,010$	$0,64 \pm 0,017$

Tabela S9: Espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pela microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Mn e ao Cr.

Mn (μM)	Cr (μM)	ROS			
		0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
0,009 (Controle)	0,00	100,00 ± 31,41	100,00 ± 27,89	100,00 ± 19,26	100,00 ± 15,37
1,45	0,00	76,03 ± 8,36	120,10 ± 8,64	111,88 ± 25,60	92,43 ± 9,79
3,64	0,00	62,06 ± 1,51	246,90 ± 58,73	268,32 ± 40,10	148,18 ± 5,09
7,28	0,00	74,65 ± 6,51	101,23 ± 5,46	166,40 ± 32,98	128,29 ± 13,20
14,56	0,00	71,53 ± 4,24	110,23 ± 23,13	100,29 ± 18,01	121,34 ± 13,69
0,009	3,84	82,67 ± 18,96	87,69 ± 16,86	91,64 ± 31,92	104,55 ± 0,81
0,009	7,68	77,14 ± 7,63	75,97 ± 2,49	55,51 ± 8,88	81,24 ± 7,79
0,009	15,36	82,15 ± 8,57	122,71 ± 31,13	99,61 ± 19,28	85,45 ± 5,30
0,009	19,20	89,20 ± 4,60	112,94 ± 17,91	55,54 ± 4,28	103,57 ± 3,45

Tabela S10: Resumo dos parâmetros e testes de ajuste do modelo de referência Adição de Concentração aplicado às taxas relativas de crescimento de *Raphidocelis subcapitata* exposta a mistura de manganês (Mn) e cromo (Cr) durante 72 hrs.

	Adição de Concentração			
	AC	S/A	DR	DL
Max	1,26	1,27	1,25	1,27
β Mn	0,52	0,5	0,7	0,46
β Cr	3,3	3,2	2,8	3,15
IC ₅₀ para Mn	3,77	3,8	3,9	3,72
IC ₅₀ para Cr	15,87	16,11	16,55	16,07
a	-	-0,31	-2,78	0
b _{DR/DL}	-	-	5,78	116,91
SS	0,57	0,57	0,52	0,56
r ²	0,78	0,78	0,79	0,78
χ^2 ou F test	17,92	0,13	2,14	0,15
Df	-	1	2	2
$p(\chi^2/F)$	2,15 x 10 ⁻⁶	>0,05	>0,05	>0,05

Max = valor máximo de resposta, β = inclinação da curva de resposta de compostos isolados, IC₅₀ = concentração mediana de inibição de crescimento; a e b_{DR/DL} = parâmetros da função; SS = soma dos quadrados dos resíduos; r² = coeficiente de regressão; teste χ^2 ou F = estatística do teste; Df = graus de liberdade; $p(\chi^2/F)$ = nível de significância do teste estatístico. Os valores foram obtidos pela ferramenta MIXTOX (Jonker et al., 2005).

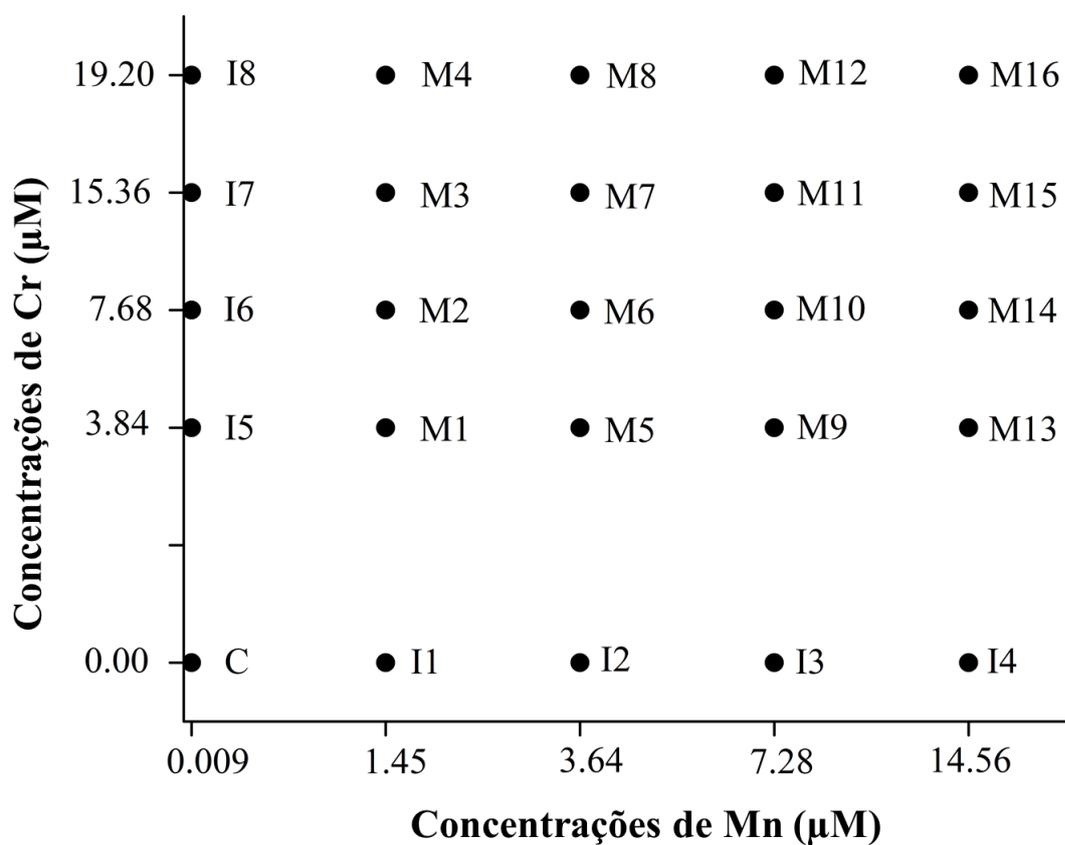


Fig. S1: Desenho fatorial completo do teste de toxicidade da mistura com manganês e cromo. I1 a I8 referem-se aos tratamentos dos metais isolados, enquanto M1 a M16 referem-se aos tratamentos de metais combinados (mistura), onde C = grupo controle (0,009 µM de Mn).

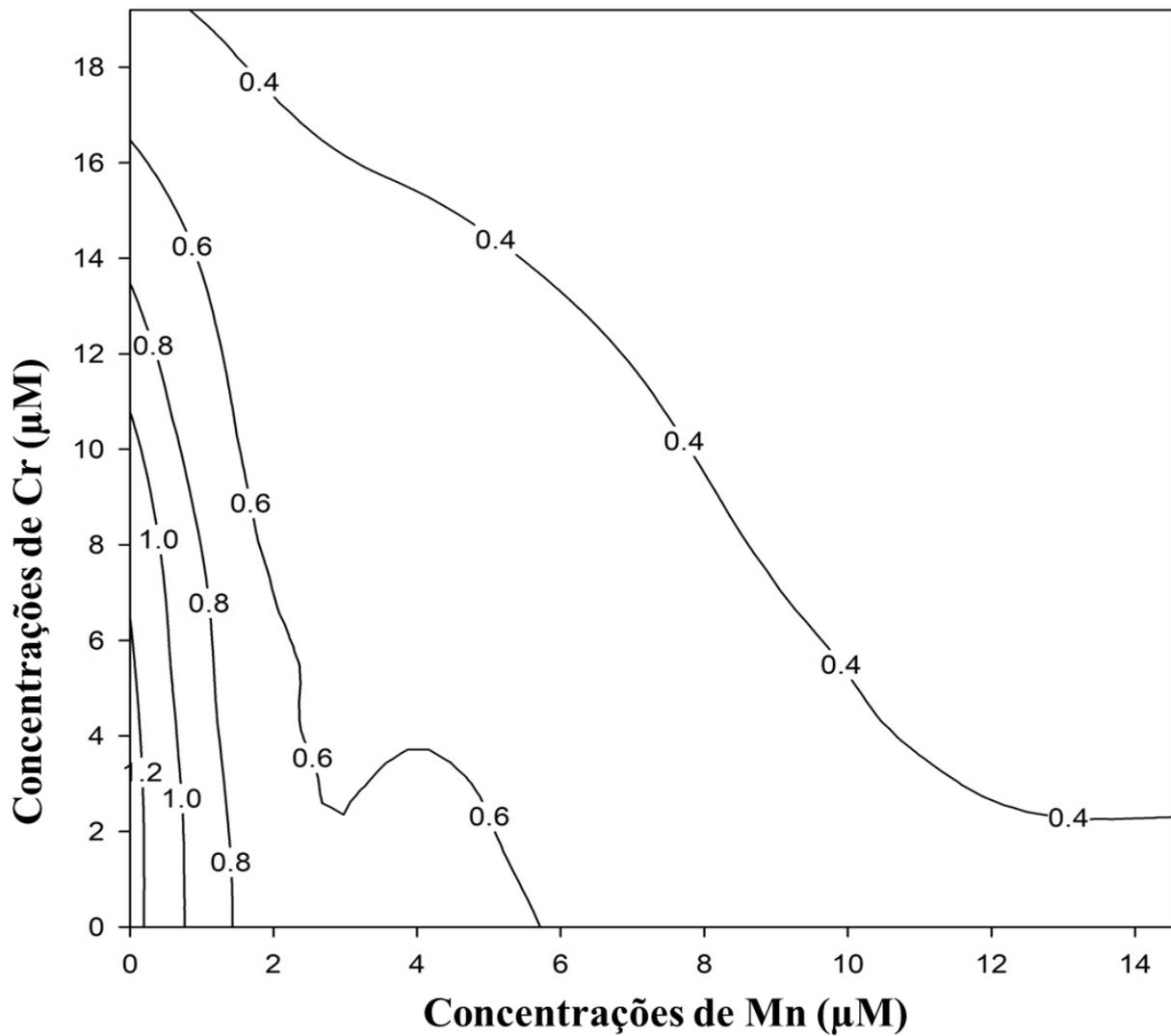


Fig.S2: Isobolograma dos efeitos da mistura dos metais na taxa relativa de crescimento da microalga *Raphidocelis subcapitata*, seguindo o modelo de referência de Adição de Concentração. Linhas lineares indicam ausência de interação, formas côncavas demonstram sinergismo e formas convexas representam antagonismo (Alloatti et al., 2013).

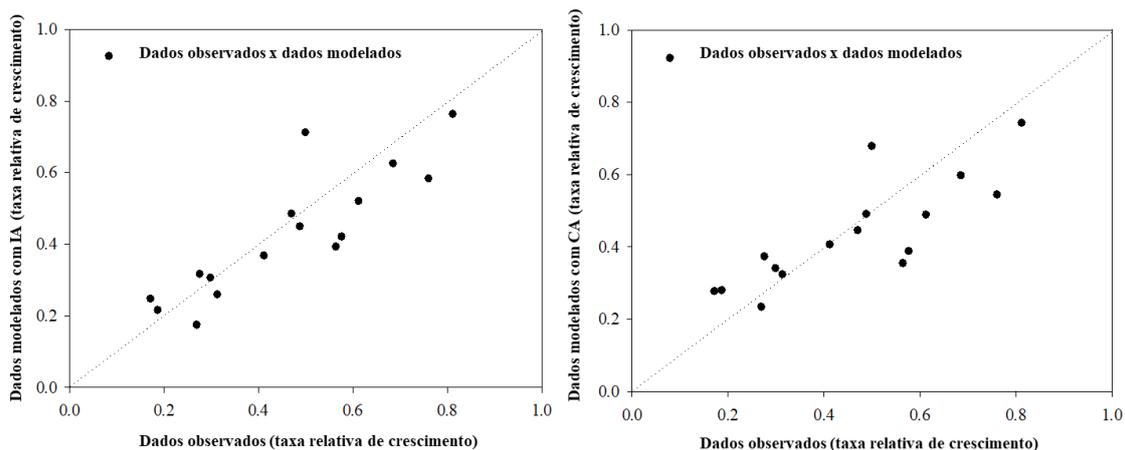


Fig. S3: Valores dos dados observados *versus* modelados da taxa relativa de crescimento obtidos dos modelos de Ação Independente (AI) e Adição de Concentração (AC), após exposição a mistura de manganês e cromo.

Referências

- Biesinger, K. E., Christensen, G. M., 1972. Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. J. Fish. Res. Bd. Canada 29, 1691-1700.
- Calabrese, A., Collier, R. S., Nelson, D. A., MacInnes, J. R., 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Biol. 18, 162–166.
- Couillard, Y., 1989. Acute Toxicity of Six Metals to the Rotifer *Brachionus calyciflorus*, with Comparisons to Other Freshwater Organisms. Toxicol. Assess. 4, 451–462.
- Fargašová, A., Bumbálová, A., Havránek, E., 1999. Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , V^{5+}) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. Chemosphere 38 (5), 1165-1173.
- Freitas, E. C., Rocha, O. 2011. Acute and chronic toxicity of chromium and cadmium to the tropical cladoceran *Pseudosidaramosa* and the implications for ecotoxicological studies. Environ. Toxicol. 29(2), 176-86.
- Hadjispyrov, S., Kungolos, A. K., Anagnostopoulos, A., 2001. Toxicity, Bioaccumulation, and Interactive Effects of Organotin, Cadmium and Chromium on *Artemia franciscana*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 49, 179-186.
- Harford, A. J., Mooney, T. J., Trenfield, M. A., Van Dam, R., 2015. Manganese toxicity to tropical freshwater species in low hardness water. Environ. Toxicol. Chem. 34 (12), 2856-2863.
- Ince, N. H., Dirilgen, N., Apikyan, G., Tezcanli, G., Üstün, B., 1999. Assessment of Toxic Interactions of Heavy Metals in Binary Mixtures: A Statistical Approach. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 365-372.
- 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. Environ. Toxicol. Chem. 24, 2701-2713.

- Keller, A. E., Zam, S. G., 1991. The acute toxicity of selected metals to the freshwater mussel, *Anodonta imbecilis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 539-546.
- Kim, S. D., Park, K. S., Gu, M. B., 2002. Toxicity of hexavalent chromium to *Daphnia magna*: influence of reduction reaction by ferrous iron. *J. Hazard. Mater.* 93, 155-164.
- Lasier, P. J., Winger, P. V., Bogenrieder, K. J., 2000. Toxicity of Manganese to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 298-304.
- Lewis, M., 1978. Acute toxicity of copper, zinc and manganese in single and mixed salt solutions to juvenile longfin dace, *Agosia chrysogaster*. *J. Fish Biol.* 13, 695-700.
- Madoni, P., Davoli, D., Gorbi, G., Vescovi, L., 1996. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. *Wat. Res.* 30 (1), 135-141.
- Martínez-Jerónimo, F., 2006. Effect of culture conditions and mother's age on the sensitivity of *Daphnia magna* Straus 1820 (Cladocera) neonates to hexavalent chromium. *Ecotoxicology* 15, 259-266.
- Pereira, M., Bartolomé, M. C., Sánchez-Fortún, S., 2013. Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: A mechanisms for chromium resistance. *Chemosphere* 93 (6), 1057-1063.
- Rathore, R. S., Khangarot, B. S., 2003. Effects of Water Hardness and Metal Concentration on a Freshwater *Tubifex Tubifex* Muller. *Water Air Soil Pollut.* 142, 341-356.
- Rodgher, S., Espíndola, E. L. G., Simões, F. C. F., Tonietto, A. E., 2012. Cadmium and Chromium Toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Microcystis aeruginosa*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55 (1), 161-169.
- Rojíčková-Padrťová, R., Maršálek, B., 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere* 38 (14), 3329-3338.
- Rosko, J. J., Rachlin, J. W., 1975. The effect of copper, zinc, cobalt and manganese on the growth of the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Bull. Torrey Bot. Club.* 102 (3), 100-106.
- Sánchez-Fortún, S., López-Rodas, V., Navarro, M., Marva, F., D'ors, A., Rouco, M., Haigh-Florez, D., Costas, E., 2009. Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium*

chlorelloides to extreme chromium contamination. Environ. Toxicol. Chem. 28 (9), 1901-1905.

Sanyal, T., Kaviraj, A., Saha, S., 2017. Toxicity and bioaccumulation of chromium in some freshwater fish. Hum. Ecol. Risk Assess. 23 (7), 1655-1667.

Stevens, D. G., Chapman, G. A., 1984. Toxicity of trivalent chromium to early life stages of steelhead trout. Environ. Toxicol. Chem. 3, 125-133.

Wong, C. K., 1992. Effects of Chromium, Copper, Nickel, and Zinc on Survival and Feeding of the Cladoceran *Moina macrocopa*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49, 593–599.

4.2. CAPÍTULO 2: Impactos da mistura binária de manganês e cromo na fotossíntese de uma microalga de água doce

Resumo

A contaminação por metais em ambientes aquáticos geralmente resulta em uma mistura desses compostos. Ainda assim, poucos estudos abordam os efeitos das misturas metálicas nos produtores primários, que pertencem à base das cadeias alimentares aquáticas. Os efeitos do manganês (Mn) e do cromo (Cr), e sua mistura binária, no desempenho fotossintético de uma clorofócea de água doce foram investigados. Levando em consideração os valores de concentração de inibição (IC) ($IC_{50-72hrs} = 5,24 \pm 0,91 \mu\text{M Mn}$ e $IC_{50-72hrs} = 17,93 \pm 5,01 \mu\text{M Cr}$), após 72 hrs de exposição da *Raphidocelis subcapitata* a ambos metais em sua forma isolada, observamos maior toxicidade do Mn (~ 3,4 vezes) em comparação ao Cr. A exposição ao Mn isolado levou a 71,3% de inibição do crescimento em $14,56 \mu\text{M}$ e afetou a eficiência do complexo de evolução de oxigênio (F_0/F_V) em cerca de 20,4% nesta mesma concentração. O rendimento quântico efetivo (Φ'_M) e a extinção fotoquímica foram reduzidos nas concentrações de 3,64, 7,28 e $14,56 \mu\text{M}$ de Mn. Além disso, o Cr induziu a ativação de processos não fotoquímicos, como demonstrado pelo aumento valores de decaimento não fotoquímicas (qN e NPQ) em 7,86 e $19,2 \mu\text{M}$. Ambos os metais diminuíram a fluorescência da clorofila *a* (Clo *a*). Em resumo, os impactos do Mn no crescimento, fotossíntese e teores de Clo *a* foram mais acentuados do que os causados pelo Cr. A combinação binária de Mn e Cr levou a efeitos sinérgicos no Φ'_M em todos os tratamentos da mistura e na F_0/F_V em todas as concentrações de Mn combinadas com a maior concentração de Cr. Nossos resultados destacam a importância de se considerar a interação de metais em estudos ecotoxicológicos, para não subestimar os efeitos desses compostos na biota aquática.

Palavras-chave: Mistura de metais, Phyto-PAM, Fotossíntese, Sinergismo, Ecotoxicologia.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são conhecidas por terem a capacidade de adaptar sua fisiologia na tentativa de lidar com cenários ambientais desfavoráveis, como limitação de nutrientes (Rocha et al., 2021), estresse metálico (Echeveste et al., 2017; Reis et al., 2021; Silva et al., 2021; Silva et al. al., 2018) e poluição por pesticidas (Mansano et al., 2017; Moreira et al., 2020). Como parte da base das cadeias alimentares aquáticas, dão suporte à níveis tróficos mais elevados (Rocha et al., 2021), apresentando uma grande relevância ecológica. Entre os contaminantes mais comuns dos ambientes aquáticos, os metais são normalmente encontrados em altas concentrações no ambiente, se comparado à outros contaminantes (Cid et al., 1995; Perales-Vela et al., 2007). Em produtores primários, os metais podem interferir no aparato fotossintético, afetando o crescimento e outros processos fisiológicos (Mallick e Mohn, 2003), levando até a alterações em níveis tróficos mais elevados (Rocha et al., 2016), afetando o equilíbrio ecológico.

O manganês (Mn) é um nutriente essencial para todos os organismos vivos (Fargašová et al., 1999), e suas propriedades redox são usadas por inúmeras enzimas. Na fotossíntese, este elemento é necessário na célula para catalisar a evolução do oxigênio (Knauer et al., 1999). O Mn existe como diferentes espécies químicas (Peters et a., 2011), mas nos ambientes aquáticos ocorre principalmente em três estados de oxidação: Mn(II), Mn(III) e Mn(IV) (Knauer et al., 1999). Em concentrações elevadas, o Mn pode se tornar tóxico para várias espécies (Calabrese et al., 1973; Fargašová et al., 1999; Harford et al., 2015; Lasier et al., 2000; Lewis et al., 1978). Este metal pode atingir os ambientes aquáticos devido a descargas de mineração e fundição, além de outros processos industriais (Harford et al., 2015; Švec et al., 2016). As concentrações de Mn em águas doces podem variar de forma ampla (Stubblefield et al., 1997). Em lagoas ao redor do Lago Dianchi na China, as concentrações desse metal variaram de 0,018 a 24,21 μM (Wang et al., 2014). Javed e Usmani (2013) relataram níveis de Mn de até 3,82 μM em riachos dominados por efluentes situados em Kasimpur, Aligarh (Índia).

Na natureza, o cromo (Cr) existe em três formas principais: a forma não carregada (Cr), a forma trivalente -Cr(III), que é a mais comum e estável, e a forma

hexavalente -Cr(VI) (Hedayatkah et al., 2018). A toxicidade deste metal e sua função biológica para diferentes organismos estão intimamente relacionadas à sua forma química elementar (Pereira et al., 2012). A alta toxicidade do Cr(VI) foi descrita para muitos organismos (Madoni et al., 1996; Martínez-Jerónimo, 2006; Rodgher et al., 2012; Rosícková-Padrťová e Marsáler, 1999; Sanyal et al., 2017), enquanto o Cr(III) é conhecido por ser menos tóxico (Baski et al., 2018). O sal de Cr(III) é amplamente utilizado em processos de curtimento, sendo os resíduos gerados geralmente lançados em corpos hídricos sem o devido tratamento (Pereira et al., 2012). Concentrações de Cr variando de 0,86 a 3,38 μM foram detectadas no rio Gomti, Índia (Gupta et al., 2014). De acordo com as Diretrizes Federais de Qualidade Ambiental do Canadá (2017), há uma estimativa de que 50-80% de todas as espécies de plantas e algas sejam afetadas negativamente por concentrações de Cr superiores a 1,92 μM .

Os parâmetros medidos pela fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM) são indicadores relevantes dos impactos negativos dos metais nos organismos fotossintéticos (Echeveste et al., 2017; Herlory et al., 2013; Silva et al., 2018). Além disso, as medidas de fluorescência da clorofila *a* (Clo *a*) em microalgas são rápidas, sensíveis e simples de realizar (Juneau et al., 2002). O uso da fluorometria PAM permite o estudo do transporte de elétrons entre o fotossistema II (FSII) e o fotossistema I (FSI) nos cloroplastos, fornecendo diferentes parâmetros que indicam o estado fisiológico da alga e sua eficiência na atividade fotossintética (Cosgrove e Borowitzka, 2010 ; Genty et al., 1989; Juneau et al., 2002; Mallick e Mohn, 2003).

Alguns parâmetros de fluorescência, como o rendimento quântico máximo do FSII (Φ_M) e o rendimento quântico efetivo do FSII (Φ'_M), são ferramentas úteis para estudos ecotoxicológicos com microalgas, pois representam, respectivamente, a capacidade de células de algas adaptadas ao escuro (Φ_M) e adaptadas à luz (Φ'_M) em converter energia luminosa em energia química. Outros parâmetros calculados pela fluorometria PAM são o decaimento fotoquímico (qP) e decaimentos não-fotoquímicos (qN e NPQ) que permitem medir os processos de conversão de energia fotossintética (Genty et al., 1989; Herlory et al., 2013; Juneau et al., 2002).

Tanto o Mn quanto o Cr podem atingir os ambientes aquáticos a partir de descargas industriais, domésticas e principalmente de mineração, entre outros

(Aharchaou et al., 2017; Harford et al., 2015). Esses metais podem acabar co-ocorrendo em ambientes aquáticos, o que destaca a importância de se investigar os efeitos das interações metálicas em estudos ecotoxicológicos. Normalmente, os critérios de qualidade da água são estabelecidos com base na toxicidade de compostos isolados (Keller e Zam, 1991) e podem subestimar os efeitos tóxicos dos metais quando combinados. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do Mn e do Cr, em suas formas isoladas e combinada (mistura binária) sobre a atividade fotossintética da microalga *Raphidocelis subcapitata*. Para exposições dos metais isolados e da mistura, foram determinados os efeitos no crescimento, rendimentos quânticos máximo e efetivo, a eficiência do complexo de evolução de oxigênio, decaimentos fotoquímicos e não-fotoquímicos, fluorescência da Clo *a* e produção de espécies reativas de oxigênio das microalgas. Nossos dados podem favorecer execução de testes de toxicidade mais aprofundados, fornecendo informações sobre as misturas de metais na fotossíntese das algas. O presente estudo é o primeiro usando biomarcadores fotossintéticos para investigar os efeitos conjuntos de Mn e Cr em uma microalga de água doce.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo algal e testes de toxicidade

O inóculo da microalga *Raphidocelis sucapitata* (Korshikov) Nygaard, Komárek, J. Kristiansen & OM Skulberg (Chlorophyceae) foi gentilmente cedido pelo Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). Os cultivos-estoque das algas foram mantidos em meio de cultura CHU-10/2 (Nalewajko e O'Mahony, 1989); com pH 7,0, intensidade luminosa \cong 3900 lux (luz fluorescente), temperatura de $25 \pm 0,5$ °C e fotoperíodo de 12 hrs/ 12 hrs claro/escuro. Para evitar a contaminação dos cultivos, foram utilizados materiais e condições estéreis na manipulação das culturas. Antes de seu uso, o meio de cultivo foi autoclavado por 20 min (a 121 °C e 1 atm acima da pressão padrão). As culturas foram suavemente agitadas manualmente 6 vezes ao dia (USEPA, 2012).

As soluções-teste de manganês e cromo foram feitas por diluições seriadas de soluções-padrão Titrisol de MnCl_2 (1000 mg L^{-1}) e CrCl_3 (1000 mg L^{-1}) (Merck, Alemanha), respectivamente. O controle continha a alga e a concentração de manganês do meio de cultivo (0,009 μM de Mn) e sem adição de Cr. Durante os testes, a concentração inicial de algas foi de 5×10^4 células mL^{-1} , inoculadas em fase exponencial de crescimento em Erlenmeyers de policarbonato de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL das soluções-teste. As concentrações de Mn isolado foram 1,45, 3,64, 7,28 e 14,56 μM de Mn, e as concentrações de Cr isolado foram 3,84, 7,68, 15,36 e 19,2 μM de Cr. Todas as concentrações foram escolhidas com base em testes preliminares. A combinação de Mn e Cr foi realizada com base em um design fatorial completo, resultando em 16 tratamentos dos metais na mistura (para uma explicação detalhada, ver Alho et al., 2022). Os experimentos duraram 72 horas e três réplicas por tratamento.

2.2. Determinação do metal

As concentrações de Mn e Cr total em todos os tratamentos com os metais isolados e com a mistura binária dos mesmos, bem como a concentração total de Mn no controle, foram medidas por espectrometria de emissão óptica com plasma

indutivamente acoplado (ICP-OES, iCAP 7000 Series, Thermo Scientific) (Fig. S1, Material suplementar). Todas as amostras foram acidificadas a 1% HNO₃ e mantidas congeladas a -20 °C até a análise. As concentrações nominais foram utilizadas para calcular os resultados porque as concentrações medidas e as nominais não diferiram em mais de 20% (OECD, 2002).

2.3. Análises citométricas

Um citômetro de fluxo (FACSCalibur – Becton Dickinson, EUA) foi usado para medir a densidade celular todos os dias em um horário fixo (Alho et al., 2019). Os procedimentos para contagem de células seguiram os descritos em Sarmiento et al. (2008), usando microesferas fluorescentes (beads) de 6 µM como padrão interno (Polysciences, Inc., Warrington, PA, EUA). A identificação das células das microalgas foi realizada em gráficos de dispersão lateral (SSC-H) *versus* fluorescência vermelha (FL3-H). O cálculo da média relativa de FL3-H (fluorescência celular média da *Clo a*) seguiu o descrito em Mansano et al. (2017), e foi expresso em unidades arbitrárias. O software CellQuest BD foi usado para aquisição de dados e o software FlowJo v.10 foi usado para análise dos citogramas. O cálculo do ROS relativo (%) foi realizado de acordo com as equações abaixo (Hong et al., 2009):

$$FL1-H_{\text{relativo}} = \log (FL1-H_{\text{amostra}}) / \log (FL1-H_{\text{beads}}) \quad (\text{eq. 1})$$

$$ROS_{\text{relativo}}(\%) = (FL1-H_{\text{relativo}}[\text{tratamento}] / FL1-H_{\text{relativo}}[\text{controle}]) \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

2.4. Parâmetros fotossintéticos

O fluorômetro de pulso de amplitude modulada Phyto-PAM (Phytoplankton Fluorometer Analyzer, Phyto-PAM, Heinz Walz, Alemanha), equipado com um drive óptico ED-101US/MP, foi usado para medir os parâmetros de fluorescência da *Clo a*. As amostras de cada tratamento foram adaptadas ao escuro por 15 min para permitir a oxidação completa dos centros de reação (CR) do FSII. Os seguintes parâmetros das células adaptadas ao escuro foram medidos diariamente: fluorescência inicial (F₀),

fluorescência máxima (F_M), rendimento quântico máximo (Φ_M) do FSII e a eficiência do complexo de evolução de oxigênio (OEC) (ilustrado por F_0/F_V) do FSII. Os parâmetros fotossintéticos das células adaptadas à luz foram medidos em 72 hrs, após 15 min de período de aclimação ao escuro: fluorescência máxima na luz (F'_M), fluorescência inicial na luz (F_S), rendimento quântico efetivo (Φ'_M), coeficiente de decaimento fotoquímico (qP), não-fotoquímico (qN) e decaimento não-fotoquímico de Stern-Volmer (NPQ). As medidas foram realizadas conforme descrito em Alho et al. (2019). Os dados brutos de todos os parâmetros fotossintéticos medidos estão apresentados nas Tabelas S1, S2, S3 e S4 (Material suplementar).

2.5. Análises estatísticas

As concentrações de inibição do Mn e do Cr (IC) foram determinadas usando a densidade celular (células mL^{-1}) medida diariamente por regressão não linear, usando uma curva logística sigmoideal de três parâmetros (SigmaPlot 11.0, Systat, 2008). A concentração de efeito não observável (CENO) e a menor concentração de efeito observável (CEO) foram determinadas estatisticamente ($p < 0,05$). Os dados foram testados para normalidade e homogeneidade de variância, e os resultados com distribuição normal foram analisados usando One Way ANOVA, seguido de testes post-hoc de Dunnett. Os resultados de distribuição não normal ou variância desigual foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis e o teste não paramétrico de Dunn. A análise estatística foi realizada no software SigmaPlot versão 11.0 (Systat, 2008).

Levando em consideração que os efeitos de uma mistura podem causar respostas mais severas (efeitos sinérgicos) ou menos severas (efeitos antagônicos) do que o efeito predito, no presente estudo foram calculados os efeitos preditos e observados da mistura de Mn e Cr, com o intuito de determinar se a combinação dos metais causou sinergismo ou antagonismo nas respostas de algas sobre o Φ_M , Φ'_M e F_0/F_V . Os procedimentos para os cálculos seguiram o descrito em Gottardi et al. (2017), calculando a razão entre o efeito predito e o efeito observado. A interação sinérgica ou antagônica entre Mn e Cr foi considerada onde os endpoints das microalgas expostas à mistura foram significativamente menores ou maiores ($p < 0,05$) do que os endpoints das microalgas do grupo controle e de qualquer um dos dois compostos isolados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados de $IC_{50-72 \text{ hrs}}$, CENO e CEO para *R. subcapitata* exposta ao Mn e ao Cr em suas formas isoladas. Nossos resultados destacam a maior toxicidade do Mn do que do Cr para esta espécie de alga (~ 3,4 vezes mais tóxica). Em 48 hrs de tratamento, o Mn afetou negativamente o crescimento das algas em quase todas as concentrações testadas (Fig. 1A), exceto para 3,64 μM . Em 72 hrs, todas as concentrações de Mn reduziram a densidade celular de *R. subcapitata*, atingindo ~ 71,3% de inibição de crescimento na concentração mais alta (14,56 μM). O crescimento das algas foi inibido apenas pelas maiores concentrações de Cr (15,36 e 19,2 μM) em 72 hrs (Fig. 1B), com uma inibição máxima de 39,15% em 19,2 μM . No entanto, em 48 hrs, as três concentrações mais altas levaram à redução do crescimento (7,68, 15,36 e 19,2 μM). Apesar disso, a menor concentração de Cr (3,84 μM) levou a um aumento da densidade celular entre 24 e 72 hrs, o que sugerimos ser um efeito de hormese, conforme discutido em nosso estudo anterior com resultado semelhante (Alho et al., 2022), no qual observamos um aumento da taxa relativa de crescimento de *R. subcapitata* e do teor de Clo *a* nessas mesmas concentrações de Cr.

Tabela 1: Concentração de inibição ($IC_{50-72\text{hrs}}$; valores \pm DP), concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO) para *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Mn e ao Cr. Os valores foram calculados com base na densidade celular (células mL^{-1}) da microalga.

	Mn		Cr	
	μM	mg L^{-1}	μM	mg L^{-1}
$IC_{50-72 \text{ hrs}}$	$5,24 \pm 0,91$	$0,28 \pm 0,05$	$17,93 \pm 5,01$	$0,93 \pm 0,26$
CENO	< 1,45	< 0,08	< 3,84	< 0,20
CEO	1,45	0,08	3,84	0,20

Utilizando a ferramenta MIXTOX (Jonker et al., 2005) em nosso estudo anterior, verificamos que a mistura de Mn e o Cr apresentaram efeitos aditivos para a *R.*

subcapitata, não apresentando desvio dos modelos de referência de Adição de concentração (AC) e Ação independente (AI) (Alho et al. 2022). Além disso, observamos que o modelo AI foi o melhor para descrever os resultados. No presente estudo, observamos a inibição do crescimento de algas na menor concentração de Mn (1,45 µM) combinada com a maior concentração de Cr (19,2 µM) (Fig. 1C, M4). Além disso, a combinação de 7,28 µM de Mn com as maiores concentrações de Cr (15,36 e 19,2 µM; M11 e M12), e os tratamentos de mistura das maiores concentrações de ambos os metais (M15: 14,56 µM Mn x 15,36 µM Cr; e M16: 14,56 µM Mn x 19,2 µM Cr) inibiram significativamente o crescimento da microalga, sendo o efeito mais acentuado o causado pelo tratamento M15 (71,77% de inibição).

A toxicidade do Cr(VI) tem sido relatada para muitos organismos (Bakshi et al., 2018; Cervantes et al., 2001), e a causa dos efeitos adversos causados por esta forma de Cr é geralmente atribuída à formação de ROS, especialmente durante a redução da forma hexavalente para a forma trivalente (Cervantes et al., 2001). No entanto, o Cr(III) tende a formar complexos fortes com hidróxidos (Rai et al., 1989), sendo, portanto, menos móvel e solúvel. Isso pode ajudar a explicar a menor toxicidade do Cr(III) quando comparado ao Mn em nosso estudo, principalmente porque a maior parte do Mn adicionado nas soluções-teste foi dissociado como Mn^{2+} livre (96,8%; Alho et al., 2022), de acordo com o MINEQL+ (versão 4.62.3; Environmental Research Software, Hallowell, ME, EUA).

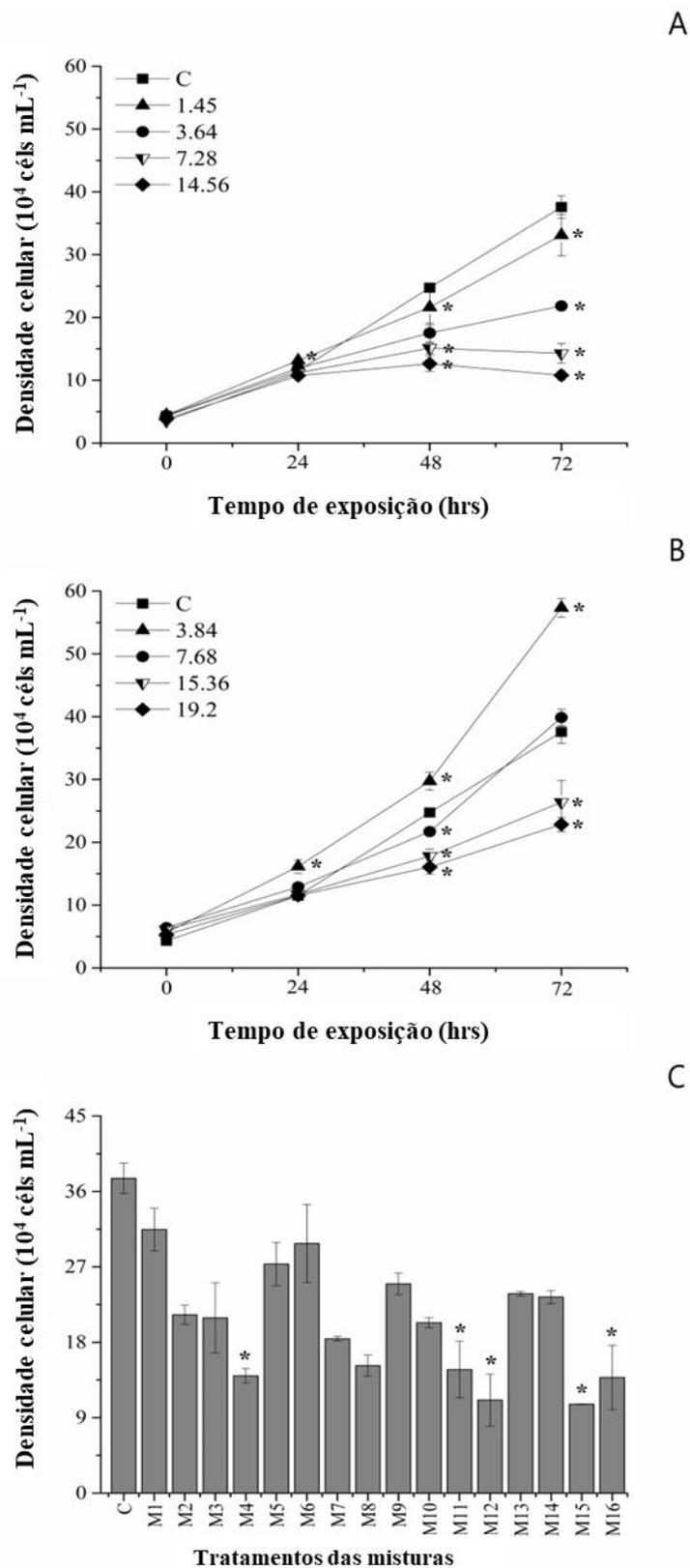


Fig. 1: Curvas de crescimento (média \pm DP) de *Raphidocelis subcapitata* ($\times 10^4$ células mL^{-1}) expostas ao manganês (A) e ao cromo (B) durante 72 hrs, e densidade celular das algas ($\times 10^4$ células mL^{-1}) após 72 hrs de exposição a misturas binária dos metais (C). O

grupo controle (0,009 μM de Mn) está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferenças significativas em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$).

Embora relativamente baixos (menor que 6,3% de variação), os efeitos negativos de Mn e Cr no Φ_M foram detectados desde 24 hrs de exposição nas concentrações mais altas de ambos os metais na forma isolada (7,28 e 14,56 μM de Mn; 15,36 e 19,2 μM de Cr) (Fig. 2A e B). Em contrapartida, a mistura de Mn e Cr causou efeitos mais acentuados neste parâmetro em todas as concentrações combinadas, o que indica sinergismo (Fig. 2C). Observamos uma diminuição máxima de 21,93% em 14,56 μM de Mn *versus* 19,2 μM de Cr (M16, Fig. 2C).

A eficiência do CEO (F_0/F_V) também foi prejudicada após exposição ao Mn isolado (Fig. 2D). De 24 a 72 hrs de tratamento, 7,28 e 14,56 μM de Mn aumentaram os valores de F_0/F_V , com alteração de 20,5% em 14,56 μM após 72 hrs. Este aumento de F_0/F_V indica uma alteração no estado de foto-oxidação da água (Herlory et al., 2013). Danos ao aparato de quebra de água já foram reportados em algas sob estresse por metal, como descrito para Cu, Cd, Ni e Zn (Mallick e Mohn, 2003). Em relação à exposição ao Cr isolado, foi detectado aumento de F_0/F_V apenas em 24 hrs, nas concentrações mais altas (15,36 e 19,2 μM) (Fig. 2E). No entanto, em 48 hrs, aparentemente a alga foi capaz de lidar com o estresse causado pelo Cr no aparato de separação de água, como demonstrado pelos valores de F_0/F_V semelhantes aos do controle, chegando mesmo a valores menores do que os do controle em 72 hrs nas concentrações de 15,36 e 19,2 μM . As concentrações combinadas de Mn e Cr levaram a uma severa alteração do processo de foto-oxidação da água, como demonstrado pelo aumento dos valores de F_0/F_V em relação ao controle em quase todas as concentrações da mistura (Fig. 2F), indicando também efeitos sinérgicos. A combinação de 14,56 μM de Mn com todas as concentrações de Cr (M13 a M16) levou a um aumento de, respectivamente, 35,3%, 29,8%, 66,2% e 86,0% em F_0/F_V .

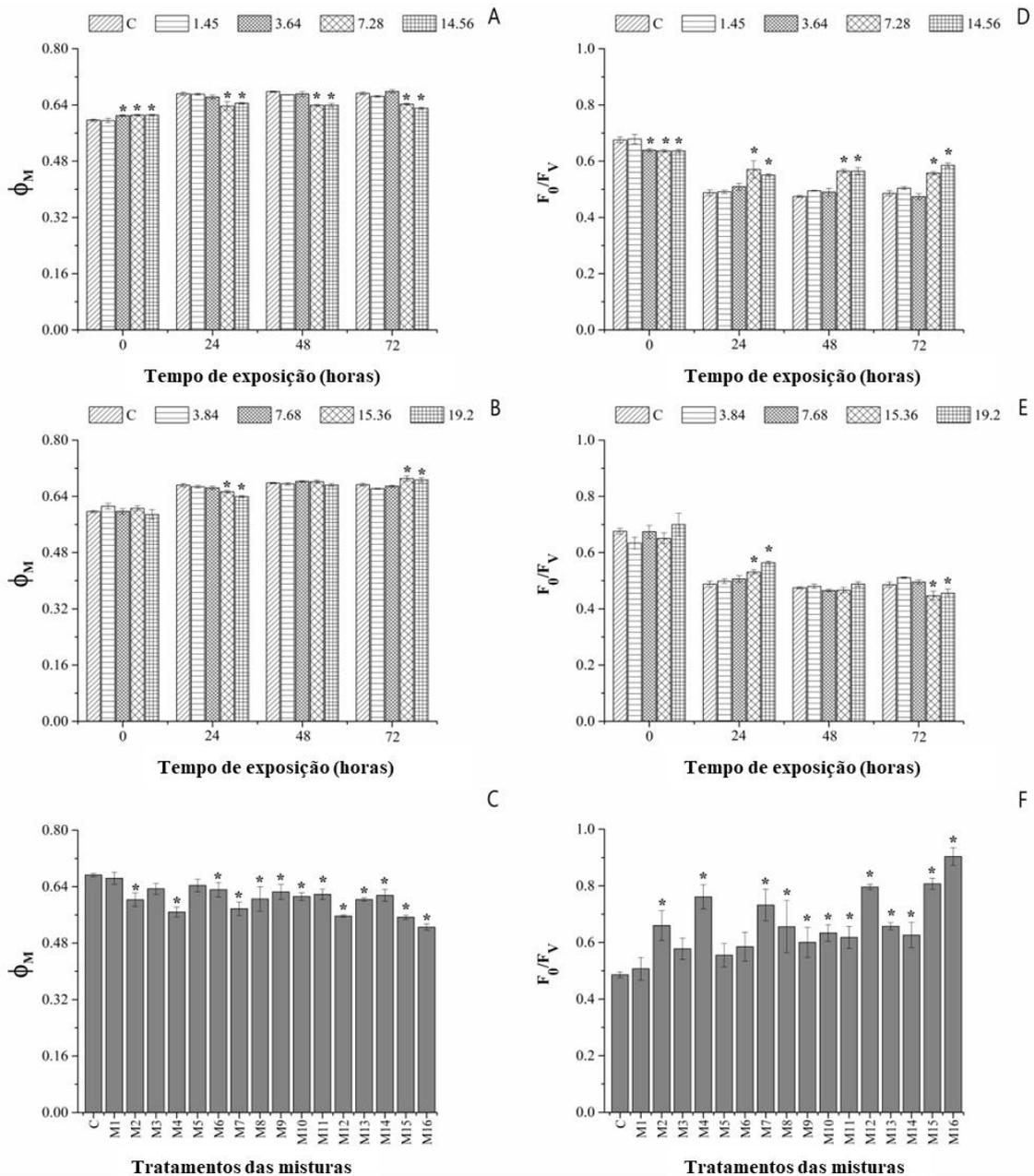


Fig. 2: Rendimento quântico máximo (Φ_M) (A, B, C; média \pm DP) e a eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_V) (D, E, F; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao manganês (A, D) e ao cromo (B,E) durante 72 hrs, e às mistura binária dos metais (C, F) após 72 hrs de exposição. O grupo controle (0,009 μM de Mn) está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferenças significativas em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$).

As respostas das algas às concentrações mais altas de Mn (7,28 e 14,56 μM) foram caracterizadas por mais de 25% de redução no Φ'_M (Fig. 3A). Em relação ao tratamento com Cr, não foi observada alteração significativa neste parâmetro (fig. 3B). Apesar disso, a combinação das concentrações mais altas de Cr (15,36 e 19,2 μM) com a mais alta concentração de Mn (14,56 μM) reduziu significativamente o Φ'_M , assim como a combinação da maior concentração de Cr (19,2 μM) com 1,45 e 7,28 μM de Mn (Fig. 3C).

O parâmetro Φ'_M foi o mais sensível para detectar os impactos do Mn (Fig. 3A) do que o Φ_M , pois detectou efeitos mais acentuados e alterações em mais concentrações em comparação com Φ_M . Em relação à exposição ao Cr (Fig. 3B), não houve alteração significativa no Φ'_M em nenhuma concentração, apesar da redução do Φ_M nas concentrações mais altas (15,36 e 19,2 μM , Fig. 2B) em 24 hrs de tratamento. A maior sensibilidade de Φ'_M em comparação ao Φ_M foi observada por Echeveste et al. (2017) ao exporem *Chlorolobion braunii* ao Cu e ao Cd. Mas Rocha et al. (2020) não observaram diferença na sensibilidade de Φ'_M em *Selenastrum gracile* exposta ao Cd, o que pode indicar que a sensibilidade de ambos os parâmetros depende do metal ou da espécie de alga utilizada nos testes.

A redução no Φ'_M também foi ilustrada pela diminuição em qP nas mesmas concentrações durante a exposição do Mn isolado (3,64, 7,28 e 14,56 μM , com redução de 11,1%, 20,3% e 21,2%, respectivamente) (Fig. 3D). O coeficiente qP representa a proporção da energia de excitação capturada pelo RC do FSII utilizada para o transporte de elétrons (Genty et al., 1989; Herlory et al., 2013). Portanto, a porção da eficiência máxima do FSII das células das algas adaptadas à luz diminuiu com o aumento das concentrações de Mn, sugerindo uma perda da capacidade do aparato fotossintético de manter a Q_A no estado oxidado (Herlory et al., 2013). Isso indica que o Mn tem um modo de ação semelhante ao de outros metais no FSII, como Ur, Cu, Cd, Ni e Zn (Herlory et al., 2013; Juneau et al., 2002; Mallick e Mohn, 2003). O impacto do Mn no aparato fotossintético de *R. subcapitata*, demonstrado pelas alterações nos valores de F_0/F_V , Φ'_M e qP, provavelmente foi a causa da redução do crescimento. Além disso, pode ajudar a explicar a maior toxicidade do Mn em comparação ao Cr. Além disso, a combinação da menor concentração de Mn (1,45 μM) com a maior concentração de Cr (19,2 μM) (M4, Fig. 3F), e a combinação das concentrações mais altas dos dois metais

(M15 e M16, Fig. 3F) levou a valores de qP reduzidos, indicando que a via fotoquímica foi prejudicada (Rocha et al., 2021), com possível fechamento dos CR e danos ao FSII (Baracho et al., 2019).

Em contraste, os valores de qP dos tratamentos com o Cr (Fig. 3E) não alteraram significativamente ($p < 0,05$), o que pode indicar que o complexo antena e as clorofilas não foram impactados (Rocha et al., 2021) pelo metal em sua forma isolada. Os valores de qP próximos a 1 que observamos nas células da alga exposta ao Cr indicam um ótimo uso da energia fotoquímica no metabolismo do carbono (Lombardi e Maldonado, 2011). Apenas os resultados dos parâmetros de decaimento das concentrações de Mn mais baixas e mais altas combinadas (1,45 e 14,56 μM , respectivamente) com todas as concentrações de Cr (ou seja, M1 a M4 e M13 a M16) (Fig. 3F) estão apresentados, uma vez que foram os tratamentos que mostraram uma diferença significativa em comparação com o controle.

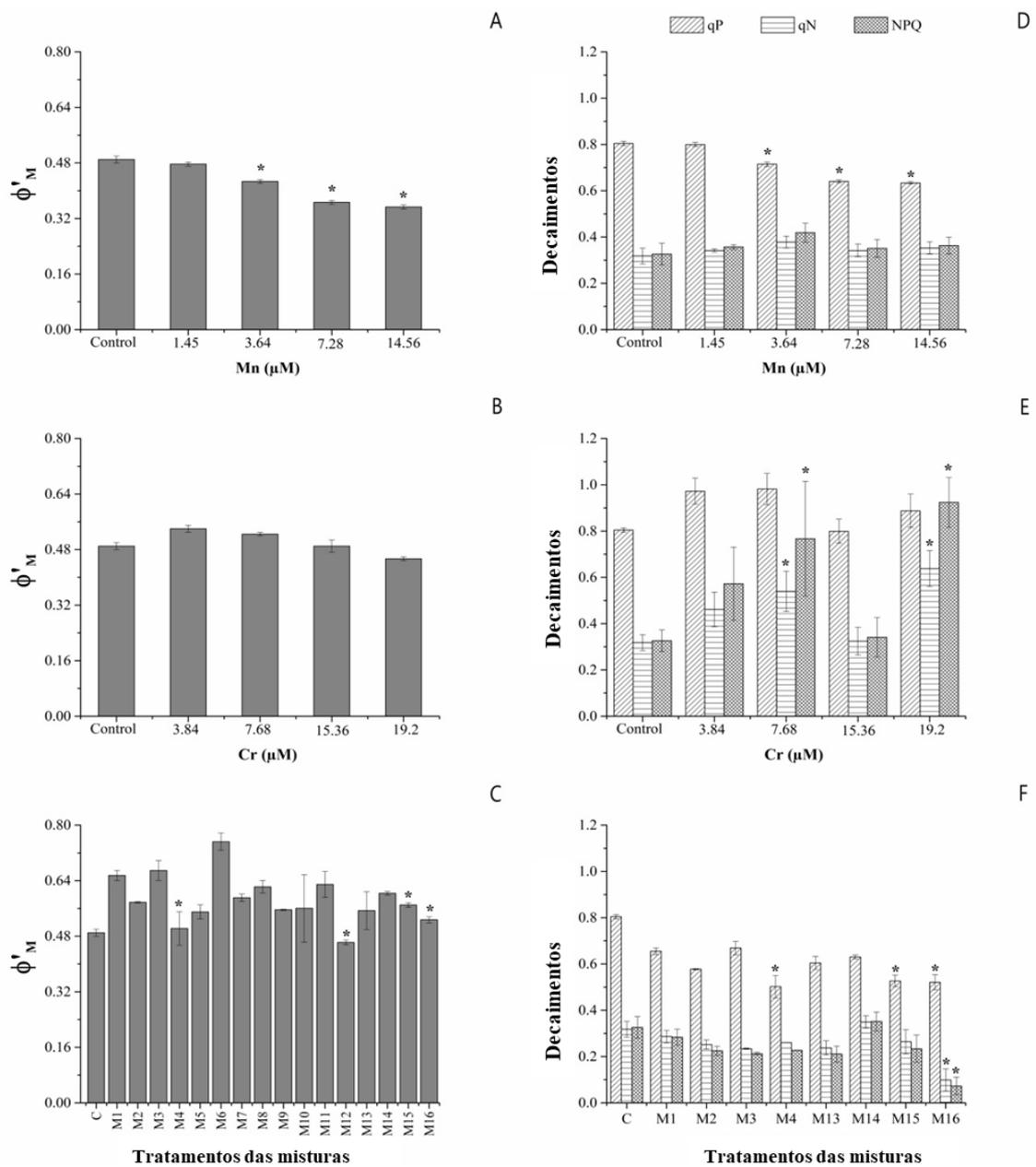


Fig. 3: Rendimento quântico efetivo (Φ'_M) (A, B, C; média \pm DP) e parâmetros de decaimento (decaimento fotoquímico – qP e decaimentos não-fotoquímicos – qN e NPQ) (D, E, F; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao manganês (A,D) e ao cromo (B,E) ao longo de 72 hrs, e à mistura binária dos metais (C, F) após 72 hrs de exposição. O grupo controle está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferença significativa dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

Tanto o qN quanto o NPQ não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$, teste de Dunnett) em comparação com o controle durante a exposição ao Mn isolado (Fig. 3D). Em contraste, esses parâmetros mostraram um aumento notável nas concentrações de 7,68 (69,7% em qN e 135,1% em NPQ) e 19,2 μM (aumento de 100,1% em qN e 183,2% em NPQ) de Cr (Fig. 3E). No caso de estresse causado por metal (por exemplo, Cd, Cu ou Ur), o qN geralmente é o parâmetro mais sensível, pois integra todos os efeitos tóxicos no processo de transporte de elétrons (Herlory et al., 2013). O aumento dos valores de qN e NPQ durante a exposição ao Cr sugere a ativação de processos não fotoquímicos pelas algas, como mecanismos de fotoproteção (Herlory et al., 2013). Essa idéia é reforçada pelo aumento nos valores do Φ_M e pelo fato de que não houve efeito no Φ'_M de *R. subcapitata* nos tratamentos com Cr após 72 hrs de exposição. Em outras palavras, o aumento do decaimento não fotoquímico foi eficiente em limitar os danos do Cr ao aparato fotossintético. A fotoproteção em algas e plantas compreende uma diversidade de mecanismos de sinalização e respostas regulatórias, que vão desde mudanças locais imediatas nas antenas coletoras de luz do CR fotossintético, regulação do pH do complexo citocromo b_6/f , até mudanças na organização do cloroplasto a respostas de aclimatação em nível de sistema que alteram a expressão gênica (Lambrev et al., 2012). Em relação à mistura de Mn e Cr, a combinação das concentrações mais altas de ambos os metais (M16: 14,56 μM de Mn versus 19,2 μM de Cr) também aumentou os valores de qN (69,0%) e NPQ (77,6%) (Fig. 3F).

As concentrações mais altas de Mn (7,28 e 14,56 μM) e Cr (7,68, 15,36 e 19,2 μM) (Fig. 4A e B) reduziram significativamente a fluorescência da Clo *a* ($p < 0,05$, teste de Dunnett) da microalga. No entanto, após a exposição às concentrações combinadas de Mn e Cr, a fluorescência da Clo *a* foi aparentemente restaurada, não apresentando diferença significativa em comparação com o controle ($p < 0,05$, teste de Dunn). Levando em conta que a inibição do fluxo de elétrons no lado doador do CR do FSII reduz a fluorescência da Clo *a* (Alho et al., 2020), podemos supor que nas concentrações mais altas de Mn (7,28 e 14,56 μM), os efeitos adversos sobre a atividade do FSII está localizada no lado doador do CR. Nenhuma das concentrações combinadas de Mn e Cr levou a mudanças significativas no nível de fluorescência da Clo *a* (Fig. 4C).

Alguns cátions metálicos, como Mn^{2+} , podem danificar as moléculas de clorofila deslocando o magnésio (Mg^{2+}) (Hauck et al., 2003) – o átomo central da molécula de Clo *a*. Isso resulta em uma fotossíntese prejudicada, uma vez que a molécula resultante desse deslocamento é instável (Baumann et al., 2009). Nosso estudo anterior demonstrou que a maior parte do Mn adicionado ao meio de cultivo dissociava-se como Mn^{2+} (96,8%; Alho et al., 2022). Portanto, podemos supor que a substituição do Mg^{2+} por Mn^{2+} foi provavelmente a causa da redução da fluorescência da Clo *a*, resultando na diminuição do Φ'_M e do qP e afetando o crescimento das algas. Cr(III) é conhecido por formar complexos fortes com hidróxidos (Rai et al., 1989), e o Cr(III) adicionado ao meio de cultura formou apenas complexos com hidróxidos em solução (89% de $Cr(OH)^{2+}$, 7,30 % de $Cr(OH)_2^+$ e 3,40% de $Cr(OH)_{3(aq)}$; Alho et al., 2022). Então, a redução da fluorescência reduzida da Clo *a* durante a exposição ao Cr não foi devido ao deslocamento de Mg^{2+} no centro da molécula. Uma possível explicação é a inibição da atividade da ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) por este metal, como relatado para *Nymphaea alba* exposta ao Cr (Vajpayee et al., 2000). O Cr pode reduzir a atividade dessa enzima, que está envolvida na regulação da biossíntese de Clo, substituindo o Mg no sítio ativo da enzima (Vajpayee et al., 2000). Levando em conta os efeitos menores do Cr no desempenho fotossintético de *R. subcapitata*, como demonstrado pelo fato de não ter ocorrido diferença significativa nos tratamentos com Cr em comparação ao controle e até mesmo os valores de alguns parâmetros superiores aos do grupo controle, podemos supor que a causa da inibição do crescimento das algas em resposta à exposição ao Cr foi provavelmente a redução do teor de Clo *a*.

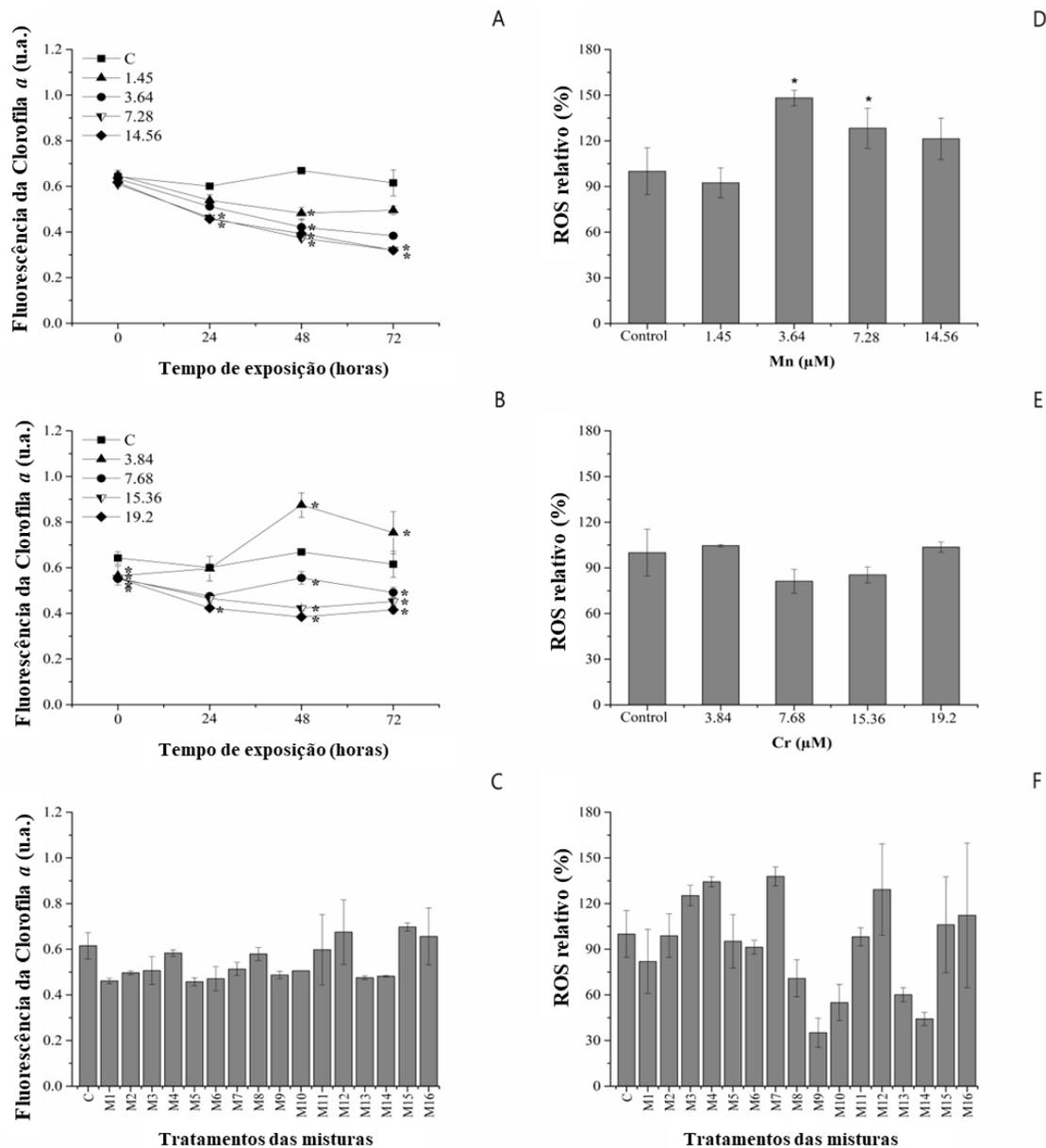


Fig. 4: Fluorescência da clorofila *a* (FL3-H relativo) (A, B, C; média ± DP) e espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species* - ROS) (D, E, F; média ± DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao manganês (A,D) e ao cromo (B,E), e à mistura binária dos metais (C, F) após 72 hrs de exposição. O grupo controle está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em µM. O símbolo * representa diferença significativa dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

Apenas as concentrações de Mn de 3,64 e 7,28 µM levaram a um aumento nos níveis de ROS (48,2% e 28,3%, respectivamente) (Fig. 4D). Não foram encontradas alterações significativas neste parâmetro após a exposição ao Cr isolado e à mistura de

Mn e Cr (Fig. 4E e F), o que foi uma surpresa, pois os metais pesados são conhecidos por induzir a formação de ROS em células de microalgas (Alho et al., 2019; Gebara et al., 2020).

No teste da mistura, observamos efeitos sinérgicos em todas as combinações de Mn e Cr em relação ao Φ_M (Tabela 2). Em relação ao F_0/F_V (Tabela 3), observamos sinergismo em todas as concentrações de Mn combinadas com a concentração mais alta de Cr (19,2 μM), e efeito antagônico em 7,28 μM de Mn *versus* todas as concentrações de Cr, exceto 19,2 μM de Cr. Além disso, todas as concentrações de Mn combinadas com 7,68 μM de Cr levaram a efeitos antagônicos neste parâmetro. Uma vez que utilizamos concentrações ambientalmente relevantes de Mn e Cr em nosso estudo, é provável que os efeitos observados da combinação desses metais no desempenho fotossintético de *R. subcapitata* possam ocorrer em ambientes aquáticos contaminados com esses metais. Como as microalgas estão na base das cadeias alimentares aquáticas, o impacto na fotossíntese desses organismos pode afetar outros níveis tróficos e prejudicar o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos.

Tabela 2: Valores de rendimento quântico máximo (Φ_M ; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à mistura de manganês (Mn) e cromo (Cr). Somente os resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$, One-Way ANOVA) em comparação com o controle ou com os metais isolados estão apresentados abaixo. Interações sinérgicas (S) foram assumidas quando os efeitos observados foram menores que os efeitos preditos, e interações antagônicas (A) foram assumidas quando os efeitos observados foram maiores que os efeitos preditos.

Mn (μM)	Cr (μM)	Rendimento quântico máximo				Dados modelados		
		Controle	Manganês	Cromo	Mistura	Predito	Observado	Efeito
1,45	7,68	0,67 \pm 0,004	0,67 \pm 0,004	0,65 \pm 0,001	0,60 \pm 0,019	0,98	0,89	S
1,45	19,2	0,67 \pm 0,004	0,67 \pm 0,004	0,69 \pm 0,007	0,57 \pm 0,014	1,02	0,84	S
3,64	7,68	0,67 \pm 0,004	0,66 \pm 0,002	0,65 \pm 0,001	0,63 \pm 0,020	0,97	0,94	S
3,64	15,36	0,67 \pm 0,004	0,66 \pm 0,002	0,67 \pm 0,003	0,58 \pm 0,019	0,98	0,86	S
3,64	19,2	0,67 \pm 0,004	0,66 \pm 0,002	0,69 \pm 0,007	0,60 \pm 0,034	1,01	0,9	S
7,28	3,84	0,67 \pm 0,004	0,68 \pm 0,004	0,66 \pm 0,001	0,62 \pm 0,020	0,98	0,93	S
7,28	7,68	0,67 \pm 0,004	0,68 \pm 0,004	0,65 \pm 0,001	0,61 \pm 0,011	0,99	0,91	S
7,28	15,36	0,67 \pm 0,004	0,68 \pm 0,004	0,67 \pm 0,003	0,62 \pm 0,015	1,00	0,92	S
7,28	19,2	0,67 \pm 0,004	0,68 \pm 0,004	0,69 \pm 0,007	0,60 \pm 0,004	1,03	0,83	S
14,56	3,84	0,67 \pm 0,004	0,64 \pm 0,002	0,66 \pm 0,001	0,60 \pm 0,004	0,93	0,9	S
14,56	7,68	0,67 \pm 0,004	0,64 \pm 0,002	0,65 \pm 0,001	0,61 \pm 0,017	0,94	0,91	S
14,56	15,36	0,67 \pm 0,004	0,64 \pm 0,002	0,67 \pm 0,003	0,55 \pm 0,005	0,95	0,82	S
14,56	19,2	0,67 \pm 0,004	0,64 \pm 0,002	0,69 \pm 0,007	0,52 \pm 0,008	0,98	0,78	S

Tabela 3: Valores de eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_V ; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à mistura de manganês (Mn) e cromo (Cr). Somente os resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$, One-Way ANOVA) em comparação com o controle ou com os metais isolados estão apresentados abaixo. Interações sinérgicas (S) foram assumidas quando os efeitos observados foram menores que os efeitos preditos, e interações antagônicas (A) foram assumidas quando os efeitos observados foram maiores que os efeitos preditos.

Mn (μM)	Cr (μM)	Eficiência do complexo de evolução do oxigênio				Dados modelados		
		Controle	Manganês	Cromo	Mistura	Predito	Observado	Efeito
1,45	7,68	0,48 \pm 0,009	0,50 \pm 0,005	0,49 \pm 0,007	0,66 \pm 0,052	1,06	0,98	A
1,45	19,2	0,48 \pm 0,009	0,50 \pm 0,005	0,46 \pm 0,014	0,76 \pm 0,042	0,97	1,13	S
3,64	7,68	-	-	-	-	-	-	-
3,64	15,36	0,48 \pm 0,009	0,47 \pm 0,009	0,45 \pm 0,016	0,73 \pm 0,056	0,90	1,09	S
3,64	19,2	0,48 \pm 0,009	0,47 \pm 0,009	0,46 \pm 0,014	0,65 \pm 0,092	0,91	0,97	S
7,28	3,84	0,48 \pm 0,009	0,56 \pm 0,005	0,51 \pm 0,002	0,60 \pm 0,053	1,20	0,89	A
7,28	7,68	0,48 \pm 0,009	0,56 \pm 0,005	0,49 \pm 0,007	0,63 \pm 0,029	1,17	0,94	A
7,28	15,36	0,48 \pm 0,009	0,56 \pm 0,005	0,45 \pm 0,016	0,62 \pm 0,039	1,05	0,91	A
7,28	19,2	0,48 \pm 0,009	0,56 \pm 0,005	0,46 \pm 0,014	0,79 \pm 0,009	1,07	1,18	S
14,56	3,84	0,48 \pm 0,009	0,58 \pm 0,032	0,51 \pm 0,002	0,66 \pm 0,012	1,26	0,98	A
14,56	7,68	0,48 \pm 0,009	0,58 \pm 0,032	0,49 \pm 0,007	0,63 \pm 0,045	1,23	0,93	A
14,56	15,36	0,48 \pm 0,009	0,58 \pm 0,032	0,45 \pm 0,016	0,81 \pm 0,019	1,10	1,2	S
14,56	19,2	0,48 \pm 0,009	0,58 \pm 0,032	0,46 \pm 0,014	0,90 \pm 0,031	1,13	1,34	S

É esperado que o comprometimento do processo de divisão de água afete o processo de transporte de elétrons fotossintético entre o FSII e o FSI (Herlory et al., 2013; Juneau et al., 2002; Mallick e Mohn et al., 2003). As concentrações de Mn (7,28 e 14,56 μM) que apresentaram alteração na F_0/F_V também apresentaram redução no Φ'_M . O endpoint mais sensível para avaliar os efeitos da exposição do Mn isolado na fotossíntese da *R. subcapitata* foi a fluorescência da Clo *a*, seguida pelo Φ'_M , uma vez que esses dois parâmetros levaram a efeitos negativos mais intensos do que os outros. O NPQ foi o endpoint mais sensível em relação à exposição ao Cr isolado para detectar o impacto dos metais na fotossíntese, seguido pelo qN. A diminuição dos valores de qP na exposição ao Mn indica que a capacidade da alga de investir em fotoquímica foi afetada, como evidenciado pela redução do Φ'_M . Provavelmente, a diminuição nos níveis de Clo *a* foi responsável pela redução do Φ'_M . Os valores alterados de F_0/F_V indicam que esse parâmetro afetado também contribuiu para a redução da eficiência fotossintética, mas em menor grau, pois o percentual de alteração deste endpoint foi menor que a alteração da fluorescência da Clo *a* nas mesmas concentrações (7,28 e 14,56 μM).

4. CONCLUSÃO

A exposição ao Mn isolado levou à redução da fluorescência da Clo *a*, aumento de F_0/F_V , diminuição dos valores de Φ'_M e qP, resultando na inibição do crescimento e provavelmente foram algumas das causas da maior toxicidade deste metal em comparação ao Cr. Por outro lado, o Cr também inibiu a fluorescência de Clo *a*, que provavelmente foi a causa da redução do crescimento, mas o aumento de qN e NPQ contribuiu para o menor efeito e possível recuperação do desempenho fotossintético de *R. subcapitata* exposta a este metal. Em relação aos parâmetros Φ_M e F_0/F_V , observamos maior impacto quando Mn e Cr foram combinados, principalmente em relação ao Φ_M , onde a mistura dos metais levou a sinergismo em todas as concentrações dos tratamentos. Portanto, ressaltamos a importância de se considerar a interação de metais em estudos ecotoxicológicos, de maneira a não subestimar os efeitos desses compostos na biota aquática.

REFERÊNCIAS

- Aharchaou, I., Rosabal, M., Liu, F., Battaglia, E., Vignati, D. A. L., 2017. Bioaccumulation and subcellular partitioning of Cr(III) and Cr(VI) in the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 182, 49-57.
- Alho, L. O. G., Gebara, R. C., Mansano, A. S., Rocha, G. S., Melão, M. G. G., 2022. Individual and Combined Effects of Manganese and Chromium on a Freshwater Chlorophyceae. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1-12. DOI 10.1002/etc.5285
- Alho, L. O. G., Gebara, R. C., Paina, K. A., Sarmiento, H., Melão, M. G. G., 2019. Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 950-959.
- Alho, L. O. G., Souza, J. P., Rocha, G. S., Mansano, A. S., Lombardi, A. T., Sarmiento, H., Melão, M. G. G., 2020. Photosynthetic, morphological and biochemical biomarkers as tools to investigate copper oxide nanoparticle toxicity to a freshwater chlorophyceae. *Environ. Pol.* 265, 114856.
- Baracho, D. H., Silva, J. C., Lombardi, A. T., 2019. The effects of copper on photosynthesis and biomolecules yield in *Chlorolobion braunii*. *J. Phycol.* 55(6), 1335-1347.
- Bashir, K., M., I., Lee, H-J., Mansoor, S., Jahn, A., Cho, M-G., 2021. The Effect of Chromium on Photosynthesis and Lipid Accumulation in Two Chlorophyte Microalgae. *Energies* 14, 2260.
- Baumann, H. A., Morrison, L., Stengel, D. B., 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM – Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1063-1075.
- Belay, A. A., 2010. Impacts of Chromium from Tannery Effluent and Evaluation of Alternative Treatment Options. *J. Environ. Prot. Sci.* 1, 53-58.
- Calabrese, A., Collier, R. S., Nelson, D. A., MacInnes, J. R., 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 18, 162–166.
- Canadian Federal Environmental Quality Guidelines (FEWGs), 2017. Canadian Environmental Protection Act, 1999, Hexavalent Chromium. FEQGs, Canada.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (3), 335-347.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E. Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* 31, 165-174.
- Cosgrove J., Borowitzka M. A., 2010. Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In Suggett D. J., Prášil O., Borowitzka M. A. (eds), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications, Developments in Applied Phycology*. Vol. IV. Springer, New York, 1–17.
- 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.

- Fargašová, A., Bumbálová, A., Havránek, E., 1999. Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , V^{5+}) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere* 38 (5), 1165-1173.
- 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. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General. Subj.* 990, 87–92.
- Gottardi, M., Birch, M. R., Dalhoff, K., Cedergreen, N., 2017. The effects of epoxiconazole and acypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction and offspring size. *Environ. Toxicol. Chem.* 36(8), 2155-2166.
- Gupta, S. K., Chabukdhara, M., Kumar, P., Singh, J., 2014. Evaluation of ecological risk of metal contamination in river Gomti, India: A biomonitoring approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110, 49-55.
- Harford, A. J., Mooney, T. J., Trenfield, M. A., Van Dam, R. A., 2015. Manganese toxicity to tropical freshwater species in low hardness water. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (12), 2856 – 2863.
- Hauck, M., Paul, A., Gross, S., Raubuch, M., 2003. Manganese toxicity in epiphytic lichens: chlorophyll degradation and interaction with iron and phosphorus. *Environ. Exp. Bot.* 49, 181-191.
- Hedayatkah, A., Creoiu, M. S., Emtiazi, G., Stal, L. J., Bolhuis, H., 2018. Bioremediation of chromium contaminated water by diatoms with concomitant lipid accumulation for biofuel production. *J. Environ. Manage.* 227, 313-320.
- 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.
- Javed, M., Usmani, N., 2013. Assessment of heavy metal (Cu, Ni, Fe, Co, Mn, Cr, Zn) pollution in effluent dominated rivulet water and their effect on glycogen metabolism and histology of *Mastacembelus armatus*. *SpringerPlus* 2, 390.
- 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. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701-2713.
- Juneau, P., El Berdey, A., Popovic, R., 2002. PAM Fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 155–164.
- Keller, A. E., Zam, S. G., 1991. The acute toxicity of selected metals to the freshwater mussel, *Anodonta imbecilis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 539-546.

- Knauer, K., Jabusch, T., Sigg, L., 1999. Manganese uptake and Mn (II) oxidation by the alga *Scenedesmus subspicatus*. *Aquat. Sci.* 61, 44-58.
- Lambrev, P. H., Miloslavina, Y., Jahns, P., Holzwarth, A. R., 2012. On the relationship between non-photochemical quenching and photoprotection of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 760-769.
- Lasier, P. J., Winger, P. V., Bogenrieder, K. J., 2000. Toxicity of Manganese to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 298-304.
- Lewis, M., 1978. Acute toxicity of copper, zinc and manganese in single and mixed salt solutions to juvenile longfin dace, *Agosia chrysogaster*. *J. Fish Biol.* 13, 695-700.
- Lombardi, A. T., Maldonado, M. T., 2011. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynth. Res.* 108, 77-87.
- Madoni, P., Davoli, D., Gorbi, G., Vescovi, L., 1996. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. *Wat. Res.* 30 (1), 135-141.
- Mallick, N., Mohn, F. H., 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 64-69.
- Mansano, A. S., Moreira, R. A., Dornfeld, H. C., Freitas, E. C., Vieira, E. V., Sarmiento, H., Rocha, O., Selegim, M. H.R., 2017. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 312-321.
- Martínez-Jerónimo, F., 2006. Effect of culture conditions and mother's age on the sensitivity of *Daphnia magna* Straus 1820 (Cladocera) neonates to hexavalent chromium. *Ecotoxicology* 15, 259-266.
- Moreira, R. A., Rocha, G. S., Silva, L. C. M., Goulart, B. V., Montagner, C. C., Melão, M. G., 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.
- Nalewajko, C., O'Mahony, M. A., 1989. Photosynthesis of algal cultures and phytoplankton following an acid pH shock. *Journal of Phycology* 25, 319-325.
- OECD – Organization for Economic Co-operation and Development, 2002. OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria. Growth Inhibition Test, 21 pp.
- Perales-Vela, H. V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C., Cañizares-Villanueva, R. O., 2007. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere* 67, 2274-2281.
- Pereira, C. D., Tychy, J. G., Ganzarolli, E. M., Quináia, S. P., 2012. Chromium fractionation and speciation in natural waters. *J. Environ. Monit.*, 14, 1559.
- Peters, A., Lofts, S., Merrington, G., Brown, B., Stubblefield, W., Harlow, K., 2011. Development of biotic ligand models for chronic manganese toxicity to fish, invertebrates, and algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (1), 2407-2415.
- Rai, D., Eary, L. E., Zachara, J. M., 1989. Environmental Chemistry of Chromium. *Sci. Total Environ.* 86, 15-23.

- Reis, L. L., Alho, L. O. G., Abreu, C. B., Melão, M. G. G., 2021. Using multiple endpoints to assess the toxicity of cadmium and cobalt for chlorophycean *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111628.
- Rocha, G. S., Lombardi, A. T., Espíndola, E. L. G., 2021. Combination of P-limitation and cadmium in photosynthetic responses of the freshwater microalga *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae). *Environ. Pol.* 275, 116673.
- 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. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02255-5>.
- Rocha, G. S., Parrish, C. C., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., 2016. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). *Ecotoxicology* 25, <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1698-7>
- Rodgher, S., Espíndola, E. L. G., Simões, F. C. F., Tonietto, A. E., 2012. Cadmium and Chromium Toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Microcystis aeruginosa*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55 (1), 161-169.
- Rojíčková-Padrťová, R., Maršálek, B., 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere* 38 (14), 3329-3338.
- Sanyal, T., Kaviraj, A., Saha, S., 2017. Toxicity and bioaccumulation of chromium in some freshwater fish. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 23 (7), 1655-1667.
- Sarmiento, H., Unrein, F., Isumbiso, 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.
- Silva, J. C., Echeveste, P., Lombardi, A. T., 2018. Higher biomolecules yield in phyto-plankton under copper exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161, 57-63.
- Stubblefield, W. A., Brinkman, S. F., Davies, P. H., Garrison, T. D., Hockett, J. R., McIntyre, M. W., 1997. Effects of water hardness on the toxicity of manganese to developing brown trout (*Salmo trutta*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16(10), 2082-2089.
- Švec, P., Kováčik, J., Hedbavný, J., Babula, P., Rotková, G., Klejdus, B., 2016. Impact of anions, cations, and pH on manganese accumulation and toxicity in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Water Air Soil Pollut.* 227, 161.
- Systat, 2008. Systat Software, Incorporation SigmaPlot for Windows version 11.0.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2012. Ecological Effects Test Guidelines, Algal Toxicity. Washington D.C., USA, 26 pp.
- Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Ali, M. B., Singh, S. N., 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* 41, 1075-1082.
- Wang, Z., Yao, L., Liu, G., Liu, W., 2014. Heavy metals in water, sediments and submerged macrophytes in ponds around the Dianchi Lake, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107, 200-206.

MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 2

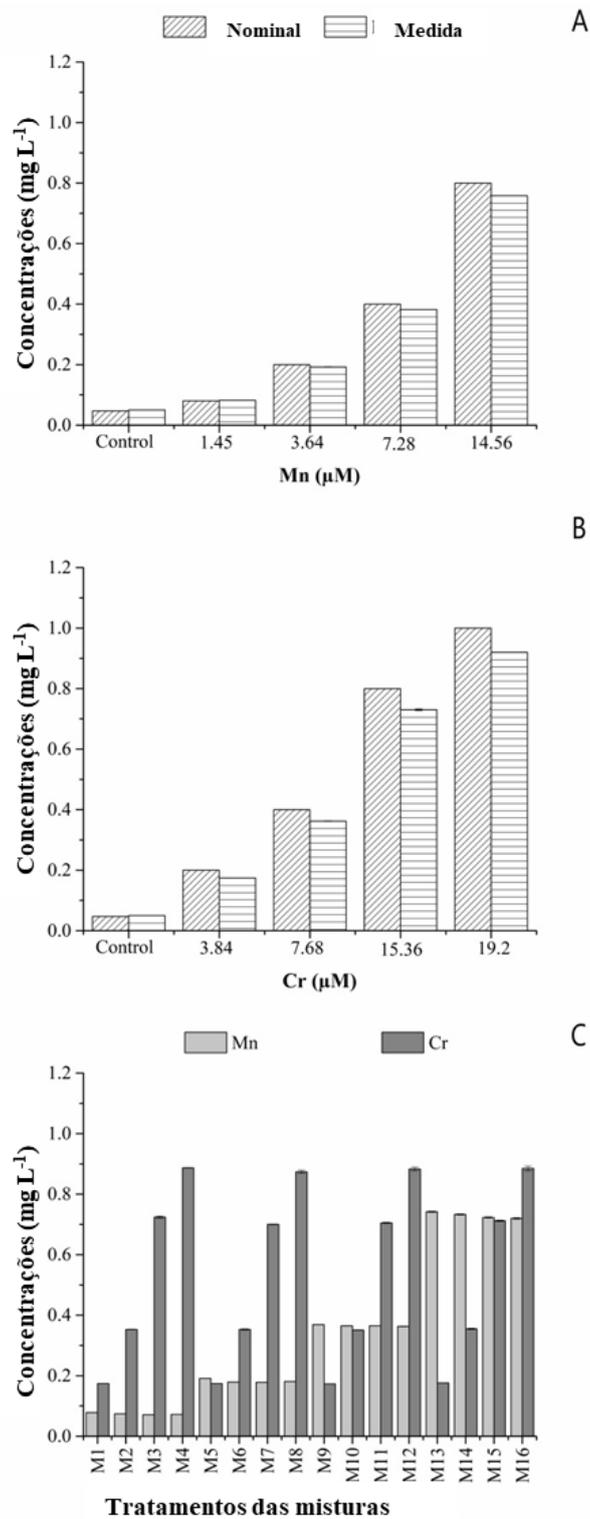


Fig. S1: Concentrações nominais e medidas de manganês (A) e cromo (B) (mg L⁻¹) no controle (somente meio de cultivo, sem adição de metal; 0,009 µM de Mn) e soluções-teste utilizadas em

experimentos com a microalga *Raphidocelis subcapitata*, e quantificação das concentrações medidas de Mn e Cr em mistura - tratamentos M1 a M16 (C).

Tabela S1: Fluorescência mínima (F_0) e fluorescência máxima (F_M) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Mn e ao Cr nas suas formas isoladas e combinadas

Mn (μM)	Cr (μM)	F_0			F_M		
		24 hrs	48 hrs	72 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
0,009 (Controle)	0,00	222,6 \pm 14,6	333,0 \pm 32,3	313,6 \pm 52,6	679,3 \pm 49,1	1034,3 \pm 101,8	958,0 \pm 147,9
1,45	0,00	210,6 \pm 6,4	295,6 \pm 1,5	307,6 \pm 9,5	639,6 \pm 21,9	893,0 \pm 6,2	918,0 \pm 22,6
3,64	0,00	350,0 \pm 14,9	291,3 \pm 14,4	337,6 \pm 26,5	1037,6 \pm 39,5	886,0 \pm 29,1	1049,3 \pm 75,9
7,28	0,00	317,6 \pm 20,5	338,3 \pm 10,4	328,3 \pm 10,1	874,3 \pm 37,5	937,3 \pm 22,8	917,6 \pm 34,1
14,56	0,00	291,0 \pm 32,3	336,6 \pm 12,8	308,0 \pm 25,2	819,3 \pm 89,5	932,6 \pm 29,1	834,6 \pm 76,1
0,00	3,84	256,3 \pm 25,9	342,3 \pm 27,4	379,3 \pm 43,8	770,3 \pm 71,6	1056,0 \pm 95,5	1122,0 \pm 130,8
0,00	7,68	185,6 \pm 19,8	256,3 \pm 4,9	341,3 \pm 3,7	552,3 \pm 53,7	807,3 \pm 10,2	1030,3 \pm 8,5
0,00	15,36	296,3 \pm 10,2	265,3 \pm 33,7	252,0 \pm 69,5	854,3 \pm 26,1	833,6 \pm 98,2	812,6 \pm 206,0
0,00	19,20	274,6 \pm 8,0	216,6 \pm 9,0	295,0 \pm 13,2	761,3 \pm 17,5	661,0 \pm 26,4	942,6 \pm 49,5
1,45	3,84	356,6 \pm 11,8	267,3 \pm 3,05	299,0 \pm 8,8	1046,0 \pm 47,1	824,3 \pm 23,6	890,3 \pm 28,6
1,45	7,68	391,0 \pm 16,5	240,6 \pm 11,5	240,0 \pm 20,9	1062,6 \pm 47,1	669,3 \pm 12,2	603,6 \pm 24,3
1,45	15,36	346,3 \pm 20,0	300,6 \pm 13,3	266,0 \pm 18,0	948,6 \pm 20,8	846,6 \pm 27,7	726,6 \pm 25,4
1,45	19,20	382,6 \pm 22,8	313,3 \pm 23,1	282,6 \pm 28,3	949,6 \pm 56,7	769,0 \pm 41,0	653,6 \pm 48,9
3,64	3,84	372,6 \pm 10,0	360,3 \pm 12,6	363,0 \pm 19,6	1049,6 \pm 35,5	1047,3 \pm 49,5	1021,6 \pm 107,3
3,64	7,68	396,6 \pm 30,6	368,0 \pm 17,7	366,3 \pm 23,0	1110,0 \pm 90,4	1041,3 \pm 38,0	993,6 \pm 10,7
3,64	15,36	248,6 \pm 18,5	351,6 \pm 23,4	324,3 \pm 11,6	632,0 \pm 34,0	896,0 \pm 35,3	769,0 \pm 43,0

3,64	19,20	231,0 ± 28,6	320,0 ± 24,6	287,6 ± 36,2	593,0 ± 48,1	834,6 ± 18,1	727,3 ± 37,1
7,28	3,84	227,0 ± 18,2	359,0 ± 23,6	366,6 ± 56,3	628,6 ± 36,0	1008,3 ± 115,0	985,0 ± 203,1
7,28	7,68	234,0 ± 7,2	329,3 ± 23,3	288,6 ± 12,2	614,3 ± 19,2	880,3 ± 37,5	744,6 ± 29,1
7,28	15,36	322,6 ± 12,2	268,0 ± 17,4	252,3 ± 17,2	846,6 ± 21,9	713,3 ± 40,6	661,0 ± 31,2
7,28	19,20	363,6 ± 24,9	311,6 ± 16,0	285,0 ± 15,5	873,0 ± 50,5	736,0 ± 42,4	643,3 ± 39,2
14,56	3,84	383,6 ± 21,5	359,0 ± 16,8	368,3 ± 23,1	1029,0 ± 49,0	975,3 ± 32,5	929,0 ± 61,9
14,56	7,68	416,3 ± 40,1	347,3 ± 43,4	341,3 ± 48,2	1079,3 ± 112,8	928,3 ± 96,7	885,3 ± 89,7
14,56	15,36	385,6 ± 7,7	307,0 ± 1,0	270,3 ± 12,5	933,3 ± 25,3	726,3 ± 6,8	605,0 ± 20,6
14,56	19,20	379,3 ± 32,0	331,6 ± 39,8	267,0 ± 39,2	899,0 ± 93,4	700,6 ± 66,0	561,6 ± 73,2

Tabela S2: Rendimento quântico máximo (Φ_M) e eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_V) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Mn e ao Cr nas suas formas isoladas e combinadas.

Mn (μM)	Cr (μM)	Φ_M			F_0/F_V		
		24 hrs	48 hrs	72 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
0,009 (Controle)	0,00	0,67 \pm 0,004	0,68 \pm 0,001	0,67 \pm 0,004	0,49 \pm 0,010	0,48 \pm 0,003	0,48 \pm 0,009
1,45	0,00	0,67 \pm 0,002	0,67 \pm 0,000	0,66 \pm 0,002	0,49 \pm 0,005	0,49 \pm 0,001	0,50 \pm 0,005
3,64	0,00	0,66 \pm 0,005	0,67 \pm 0,006	0,68 \pm 0,004	0,51 \pm 0,012	0,49 \pm 0,014	0,47 \pm 0,009
7,28	0,00	0,63 \pm 0,012	0,64 \pm 0,002	0,64 \pm 0,002	0,57 \pm 0,030	0,56 \pm 0,006	0,55 \pm 0,005
14,56	0,00	0,64 \pm 0,001	0,64 \pm 0,004	0,63 \pm ,003	0,55 \pm 0,004	0,56 \pm 0,012	0,58 \pm 0,008
0,00	3,84	0,67 \pm 0,003	0,67 \pm 0,003	0,66 \pm 0,001	0,50 \pm 0,008	0,48 \pm 0,007	0,48 \pm 0,007
0,00	7,68	0,66 \pm 0,005	0,68 \pm 0,002	0,67 \pm 0,003	0,51 \pm 0,011	0,46 \pm 0,004	0,46 \pm 0,004
0,00	15,36	0,65 \pm 0,003	0,68 \pm 0,004	0,69 \pm 0,007	0,53 \pm 0,007	0,46 \pm 0,009	0,46 \pm 0,009
0,00	19,20	0,64 \pm 0,002	0,67 \pm 0,003	0,69 \pm 0,006	0,56 \pm 0,005	0,49 \pm 0,008	0,48 \pm 0,008
1,45	3,84	0,66 \pm 0,004	0,67 \pm 0,007	0,66 \pm 0,017	0,51 \pm 0,009	0,48 \pm 0,016	0,48 \pm 0,016
1,45	7,68	0,63 \pm 0,002	0,64 \pm 0,012	0,60 \pm ,019	0,58 \pm 0,006	0,56 \pm 0,031	0,56 \pm 0,031
1,45	15,36	0,63 \pm 0,013	0,64 \pm 0,016	0,63 \pm ,015	0,57 \pm 0,033	0,55 \pm 0,038	0,55 \pm 0,038
1,45	19,20	0,59 \pm 0,001	0,59 \pm 0,009	0,57 \pm 0,013	0,67 \pm 0,003	0,69 \pm 0,026	0,68 \pm 0,026
3,64	3,84	0,64 \pm 0,002	0,65 \pm 0,005	0,64 \pm 0,017	0,55 \pm 0,006	0,52 \pm 0,011	0,52 \pm 0,011
3,64	7,68	0,64 \pm 0,002	0,65 \pm 0,009	0,63 \pm 0,020	0,55 \pm 0,004	0,55 \pm 0,023	0,54 \pm 0,023
3,64	15,36	0,60 \pm 0,008	0,61 \pm 0,010	0,57 \pm 0,019	0,64 \pm 0,024	0,64 \pm 0,029	0,64 \pm 0,029

3,64	19,20	$0,61 \pm 0,016$	$0,62 \pm 0,023$	$0,60 \pm 0,034$	$0,63 \pm 0,045$	$0,62 \pm 0,061$	$0,62 \pm 0,061$
7,28	3,84	$0,64 \pm 0,015$	$0,64 \pm 0,021$	$0,62 \pm 0,020$	$0,56 \pm 0,037$	$0,56 \pm 0,052$	$0,55 \pm 0,052$
7,28	7,68	$0,62 \pm 0,004$	$0,62 \pm 0,011$	$0,61 \pm 0,011$	$0,61 \pm 0,012$	$0,59 \pm 0,028$	$0,59 \pm 0,028$
7,28	15,36	$0,62 \pm 0,006$	$0,62 \pm 0,005$	$0,62 \pm 0,014$	$0,61 \pm 0,015$	$0,60 \pm 0,014$	$0,60 \pm 0,014$
7,28	19,20	$0,58 \pm 0,004$	$0,58 \pm 0,004$	$0,56 \pm 0,002$	$0,71 \pm 0,013$	$0,73 \pm 0,014$	$0,73 \pm 0,014$
14,56	3,84	$0,63 \pm 0,005$	$0,63 \pm 0,006$	$0,60 \pm 0,004$	$0,59 \pm 0,015$	$0,58 \pm 0,017$	$0,58 \pm 0,017$
14,56	7,68	$0,61 \pm 0,005$	$0,62 \pm 0,019$	$0,61 \pm 0,017$	$0,63 \pm 0,013$	$0,60 \pm 0,050$	$0,60 \pm 0,050$
14,56	15,36	$0,59 \pm 0,002$	$0,57 \pm 0,004$	$0,55 \pm 0,005$	$0,70 \pm 0,008$	$0,73 \pm 0,013$	$0,73 \pm 0,013$
14,56	19,20	$0,57 \pm 0,009$	$0,52 \pm 0,021$	$0,52 \pm 0,008$	$0,73 \pm 0,027$	$0,90 \pm 0,078$	$0,90 \pm 0,078$

Tabela S3: Fluorescência inicial (F_S) e máxima das algas adaptadas à luz (F'_M), e rendimento quântico efetivo (Φ'_M) da microalga *Raphidocelis subcapitata* em 72 hrs de exposição ao Mn e ao Cr em suas formas isoladas e combinadas.

Mn (μM)	Cr (μM)	F_S	F'_M	Φ'_M
0,009 (Controle)	0,00	368,4 \pm 47,94	720,7 \pm 88,5	0,49 \pm 0,010
1,45	0,00	355,2 \pm 8,98	676,6 \pm 21,7	0,47 \pm 0,005
3,64	0,00	424,0 \pm 34,49	740,3 \pm 63,0	0,42 \pm 0,005
7,28	0,00	431,4 \pm 25,5	680,0 \pm 42,6	0,36 \pm 0,005
14,56	0,00	397,1 \pm 45,09	613,6 \pm 73,3	0,35 \pm 0,005
0,00	3,84	328,7 \pm 18,0	713,4 \pm 47,0	0,54 \pm 0,010
0,00	7,68	281,3 \pm 36,09	590,3 \pm 77,9	0,52 \pm 0,005
0,00	15,36	323,1 \pm 40,0	636,9 \pm 90,7	0,49 \pm 0,017
0,00	19,20	247,9 \pm 29,4	453,2 \pm 56,1	0,45 \pm 0,005
1,45	3,84	420,5 \pm 4,9	705,5 \pm 6,3	0,40 \pm 0,007
1,45	7,68	346,0 \pm 2,8	504,2 \pm 3,0	0,31 \pm 0,007
1,45	15,36	364,8 \pm 35,9	604,7 \pm 29,7	0,40 \pm 0,028
1,45	19,20	434,7 \pm 48,5	601,0 \pm 74,5	0,27 \pm 0,007
3,64	3,84	661,2 \pm 30,4	1029,3 \pm 28,7	0,35 \pm 0,007
3,64	7,68	345,5 \pm 37,9	545,7 \pm 40,5	0,36 \pm 0,014
3,64	15,36	408,0 \pm 24,0	588,2 \pm 42,2	0,30 \pm 0,007
3,64	19,20	360,0 \pm 14,1	547,7 \pm 55,1	0,33 \pm 0,035
7,28	3,84	580,3 \pm 28,8	884,7 \pm 32,9	0,34 \pm 0,021
7,28	7,68	526,0 \pm 16,5	771,8 \pm 9,6	0,32 \pm 0,028
7,28	15,36	358,7 \pm 41,9	544,0 \pm 61,7	0,34 \pm 0,007
7,28	19,20	376,5 \pm 4,4	508,5 \pm 20,5	0,25 \pm 0,000
14,56	3,84	489,8 \pm 3,5	738,0 \pm 12,2	0,34 \pm 0,014
14,56	7,68	445,5 \pm 70,4	671,2 \pm 107,2	0,33 \pm 0,007
14,56	15,36	3550,1 \pm 30,8	483,5 \pm 37,5	0,26 \pm 0,007
14,56	19,20	414,8 \pm 45,5	561,5 \pm 52,1	0,25 \pm 0,000

Tabela S4: Coeficientes de decaimento fotoquímico (qP) e não-fotoquímicos (qN e NPQ) da microalga *Raphidocelis subcapitata* em 72 hrs de exposição ao Mn e ao Cr, em suas formas isoladas e combinadas.

Mn (μM)	Cr (μM)	qP	qN	NPQ
0,009 (Controle)	0,00	$0,80 \pm 0,010$	$0,32 \pm 0,033$	$0,33 \pm 0,046$
1,45	0,00	$0,80 \pm 0,009$	$0,34 \pm 0,006$	$0,36 \pm 0,010$
3,64	0,00	$0,71 \pm 0,009$	$0,38 \pm 0,025$	$0,42 \pm 0,040$
7,28	0,00	$0,64 \pm 0,006$	$0,34 \pm 0,027$	$0,35 \pm 0,038$
14,56	0,00	$0,63 \pm 0,005$	$0,35 \pm 0,026$	$0,36 \pm 0,036$
0,00	3,84	$0,97 \pm 0,056$	$0,46 \pm 0,074$	$0,57 \pm 0,15$
0,00	7,68	$0,98 \pm 0,067$	$0,54 \pm 0,087$	$0,76 \pm 0,247$
0,00	15,36	$0,80 \pm 0,052$	$0,32 \pm 0,059$	$0,34 \pm 0,084$
0,00	19,20	$0,89 \pm 0,072$	$0,64 \pm 0,077$	$0,92 \pm 0,107$
1,45	3,84	$0,65 \pm 0,014$	$0,29 \pm 0,027$	$0,28 \pm 0,034$
1,45	7,68	$0,58 \pm 0,002$	$0,25 \pm 0,019$	$0,22 \pm 0,020$
1,45	15,36	$0,67 \pm 0,028$	$0,23 \pm 0,002$	$0,21 \pm 0,005$
1,45	19,20	$0,50 \pm 0,048$	NC	NC
3,64	3,84	$0,55 \pm 0,019$	NC	NC
3,64	7,68	$0,75 \pm 0,024$	$0,58 \pm 0,032$	$0,83 \pm 0,114$
3,64	15,36	$0,60 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,000$	$0,29 \pm 0,006$
3,64	19,20	$0,62 \pm 0,018$	$0,303 \pm 0,141$	$0,30 \pm 0,172$
7,28	3,84	$0,55 \pm 0,001$	NC	NC
7,28	7,68	$0,52 \pm 0,058$	NC	NC
7,28	15,36	$0,60 \pm 0,004$	$0,25 \pm 0,051$	$0,23 \pm 0,061$
7,28	19,20	$0,51 \pm 0,047$	$0,27 \pm 0,038$	$0,24 \pm 0,044$
14,56	3,84	$0,60 \pm 0,027$	$0,24 \pm 0,030$	$0,21 \pm 0,034$
14,56	7,68	$0,63 \pm 0,008$	$0,35 \pm 0,026$	$0,35 \pm 0,041$
14,56	15,36	$0,52 \pm 0,025$	$0,26 \pm 0,052$	$0,23 \pm 0,059$
14,56	19,20	$0,52 \pm 0,032$	$0,10 \pm 0,047$	$0,07 \pm 0,037$

* NC representa os tratamentos cujos resultados não foram calculados, devido a problemas experimentais na medição desses parâmetros.

Tabela S5: Valores de rendimento quântico efetivo (Φ'_M ; média \pm DP) de *Raphidocelis subcapitata* exposta às misturas binárias de manganês (Mn) e cromo (Cr). Apenas os resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$, One-Way ANOVA) do controle ou da exposição aos metais isolados estão apresentados abaixo. Interações sinérgicas (S) foram assumidas quando os efeitos observados foram menores do que os efeitos preditos, e interações antagônicas (A) foram assumidas quando os efeitos observados foram maiores do que os efeitos preditos.

Mn (μ M)	Cr (μ M)	Rendimento quântico efetivo				Dados modelados		
		Controle	Manganês	Cromo	Mistura	Predito	Observado	Efeito
1,45	19,2	0,49 \pm 0,01	0,48 \pm 0,005	0,45 \pm 0,005	0,50 \pm 0,048	0,90	1,02	A
7,28	19,2	0,49 \pm 0,01	0,37 \pm 0,005	0,45 \pm 0,005	0,46 \pm 0,006	0,69	0,94	A
14,56	15,36	0,49 \pm 0,01	0,35 \pm 0,005	0,49 \pm 0,017	0,57 \pm 0,006	0,72	1,16	A
14,56	19,2	0,49 \pm 0,01	0,35 \pm 0,005	0,45 \pm 0,005	0,53 \pm 0,008	0,67	1,07	A

4.3. CAPÍTULO 3: Efeitos do manganês e cromo, em exposição individual e em mistura, nos compostos de reserva de energia da microalga *Raphidocelis subcapitata*

Resumo

A biota aquática de ambientes contaminados por metais está frequentemente em contato com vários compostos químicos simultaneamente. As microalgas são organismos-modelo na ecotoxicologia aquática devido à sua alta sensibilidade a diversos produtos químicos. Além disso, esses organismos podem alterar sua composição bioquímica em condições de estresse. Para obter dados em cenário mais realista, objetivamos avaliar os efeitos do manganês (Mn) e do cromo (Cr), isolados e em mistura, no crescimento (taxa relativa de crescimento - TRC), fluorescência média da clorofila *a* (Clo *a*), tamanho relativo da célula, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e compostos de reserva de energia (carboidratos totais, lipídios totais e composição de classes lipídicas) da microalga *Raphidocelis subcapitata*. Apenas o Mn inibiu significativamente o crescimento das algas após 96 hrs de exposição, com um valor de IC_{50-96 hrs} de $4,96 \pm 0,51 \mu\text{M}$. Este metal induziu aumento da produção de ROS e do teor de lipídios totais, este último provavelmente como um mecanismo de defesa para diminuir os níveis de ROS dentro das células. O Cr foi 3,3 vezes menos tóxico que o Mn (IC_{50-96 hrs} = $16,55 \pm 10,28 \mu\text{M Cr}$), e nas concentrações mais baixas (3,84 e 7,68 μM), observamos estímulo da TRC. A fluorescência média da Clo *a* e o teor de carboidratos totais diminuíram em resposta a ambos os metais. Os tratamentos das misturas apresentaram efeitos antagônicos em quase todas as concentrações combinadas de Mn e Cr com relação à produção de carboidratos. A combinação das concentrações mais altas de ambos os metais levou a efeitos sinérgicos no teor de lipídios, embora as concentrações intermediárias dos tratamentos de mistura tenham variado entre efeitos sinérgicos e antagônicos. Cada metal levou a diferentes respostas quanto à composição de classes lipídicas. De maneira geral, o Mn levou à aumento dos níveis de hidrocarbonetos alifáticos (HC), cetona (KET), ácidos graxos livres (FFA), esteróis livres (ST) e lipídios polares móveis de acetona (AMPL). Ao mesmo tempo, a exposição ao Cr diminuiu as concentrações de triglicerídeos (TAG), ST e AMPL. Os dois metais levaram a um aumento no teor de fosfolipídios (PL), possivelmente como uma tentativa de manter a integridade da membrana, reduzindo a internalização do metal e seus efeitos adversos. As alterações nos compostos de reserva de energia observadas neste trabalho podem levar à alterações no valor nutricional das algas e na

energia a ser transferida para níveis tróficos superiores, o que pode gerar impacto em todo o ecossistema aquático.

Palavras-chave: Misturas de metais, Biomarcadores bioquímicos, Classes lipídicas, Fitoplâncton, Ecotoxicologia.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos ambientes aquáticos por resíduos metálicos tem sido uma grande preocupação com relação aos riscos para a biota aquática desde o início da revolução industrial (Keller e Zam, 1991), uma vez que esses ambientes são geralmente os principais sumidouros de poluentes metálicos (Velma et al., 2009). Geralmente, os critérios de qualidade da água são baseados na toxicidade de compostos isolados, embora os metais sejam frequentemente encontrados em misturas em corpos d'água contaminados (Keller e Zam, 1991). Além disso, a mistura de metais pode multiplicar, suprimir ou adicionar os efeitos dos compostos isolados (Ince et al., 1999).

Como um elemento essencial para todos os organismos, o Mn é um co-fator para muitas reações enzimáticas (Fargašová et al., 1999) devido às suas propriedades redox (Knauer et al., 1999). Ocorre principalmente em três estados de oxidação nos ambientes aquáticos: Mn(II)^+ , Mn(III)^+ e Mn(IV)^+ (Knauer et al., 1999). Este metal é necessário para catalisar a evolução do oxigênio em organismos fotossintéticos porque faz parte do aparelho de quebra da água (Knauer et al., 1999; Sunda e Huntsman, 1985). Em altas concentrações, o Mn pode se tornar tóxico (Hauck et al., 2003; Peters et al., 2011; Biesinger e Christensen, 1972). A toxicidade do Mn já foi relatada para algas (Harford et al., 2015), Cnidaria (Harford et al., 2015), Rotifera (Couillard et al., 1989), Crustáceo (Lasier et al., 2000), e peixes (Harford et al., 2015; Lewis, 1978). As concentrações de Mn em águas doces podem variar de níveis baixos (da ordem de ng) a várias centenas de mg L^{-1} , principalmente porque este metal é um constituinte comum de descargas pontuais e difusas de mineração, fundição e outras atividades industriais (Stubblefield et al., 1997). Amostras de água do Centro-leste norte da China foram reportadas com concentrações de Mn variando de $0,37 \mu\text{M}$ a $3,09 \mu\text{M}$, por Zhong et al. (2018). No rio Mvudi (África do Sul), os níveis de Mn variaram de $1,47$ a $9,47 \mu\text{M}$ (Edokpayi et al., 2016).

O cromo é um metal amplamente utilizado devido à sua capacidade de proteger materiais da degradação ambiental (Bahnhart, 2008), como para a preservação da madeira (Rodgher et al., 2012). Esse uso massivo aumenta as chances de contaminação ambiental por esse metal (Cervantes et al., 2001). O Cr pode existir em todos os estados de oxidação de -2 a $+6$ (Bahnhart, 2008), embora as formas mais comuns e estáveis sejam o Cr(III) trivalente e o Cr(VI) hexavalente (Bakshi e Panigrahi, 2018; Cervantes et al., 2001; Rodríguez et al., 2007). O Cr(III) é um metal não essencial para microalgas e é frequentemente encontrado em descargas industriais de curtumes, siderurgia, têxteis, galvanoplastia, mineração, tingimento e fertilizantes

artificiais (Bakshi e Panigrahi, 2018; Rodgher et al., 2012). Em um córrego próximo à bacia hidrográfica do Rio das Pedras (Guarapuava, Paraná, Brasil), localizado próximo a um córrego de descarte de efluentes de curtume, foram detectadas concentrações de Cr variando de 0,100 a 2,02 μM (Pereira et al., 2012). Efluentes não tratados de descargas industriais podem conter concentrações tão altas quanto 1,53 – 1,92 mM deste metal (Sánchez-Fortún et al., 2009). O Cr(III) é a forma comum encontrada na natureza e, por isso, foi escolhido para ser utilizado em nosso estudo. O Cr já foi reportado como tóxico para muitos organismos, como fitoplâncton (Kováčik et al., 2015; Rodgher et al., 2012), macrófita (Ince et al., 1999), zooplâncton (Freitas e Rocha, 2011), mexilhão (Keller e Zam, 1991) e peixes (Velma et al., 2009).

A composição bioquímica das algas atua como determinante no estabelecimento do valor nutricional que pode ser transferido para os demais níveis tróficos da cadeia alimentar aquática (Rodríguez et al., 2007). O estresse induzido pela exposição a um metal muitas vezes causa alteração na composição bioquímica das células algais (Chia et al., 2015; Rocha et al., 2016; Silva et al., 2018), o que pode impactar significativamente o ecossistema aquático. As microalgas podem alterar suas vias metabólicas para lidar com o estresse ambiental (Chia et al., 2013; Liu et al., 2018), modificando a produção de compostos de reserva energética, como carboidratos e lipídios (Reis et al., 2021; Rocha et al., 2016), e qualquer impacto bioquímico pode acabar sendo transferido para outros níveis tróficos. Algumas classes lipídicas tendem a aumentar sob estresse metálico, como TAG, ST e PL, e essas mudanças tem sido consideradas como mecanismos de defesa das células de algas relacionadas à proteção da membrana (Chia et al., 2015; Rocha et al., 2016).

Poucos estudos avaliaram alterações fisiológicas e bioquímicas mais profundas em algas expostas ao Cr e ao Mn (Kováčik et al., 2015; Šveck et al., 2016; Singh e Kashyap, 1978; Volland et al., 2012). Em relação às misturas de Mn e Cr, não há estudos sobre a toxicidade conjunta desses metais para algas a nível bioquímico. Portanto, nosso objetivo foi investigar os efeitos tóxicos isolados e combinados de Mn e Cr para a microalga *Raphidocelis subcapitata*, usando como parâmetros a taxa relativa de crescimento (TRC), fluorescência média da clorofila *a* (Clo *a*), tamanho relativo da célula, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), carboidratos totais e teor de lipídios totais. Além disso, foram avaliados os efeitos da exposição ao Mn e Cr isolados na composição da classe lipídica das algas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo das algas e testes de toxicidade

O inóculo da clorofíceia *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) Nygaard, Komárek, J. Kristiansen & O. M. Skulberg foi obtido do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). As culturas estoque das microalgas foram mantidas em meio de cultivo CHU-10/2 (Nalewajko e O'Mahony, 1989). As culturas foram mantidas em condições controladas de intensidade luminosa ($\cong 3900$ lux, luz fluorescente), temperatura ($25 \pm 0,5$ °C) e fotoperíodo (12 hrs/12 hrs ciclo claro/escuro), com pH ajustado para 7,0. Condições e materiais estéreis foram usados na manipulação dos cultivos para evitar a contaminação da cultura. O meio de cultivo foi autoclavado por 20 min (a 121 °C e 1 atm acima da pressão padrão) antes de seu uso. As culturas foram suavemente agitadas manualmente 6 vezes ao dia (USEPA, 2012).

As soluções padrão Titrisol de MnCl_2 (1000 mg L^{-1}) e CrCl_3 (1000 mg L^{-1}) (Merck, Alemanha) foram utilizadas para preparar as soluções-teste de manganês e cromo, respectivamente, por diluição seriada. Os ensaios foram realizados nas seguintes concentrações de Mn em sua forma isolada: $0,009 \mu\text{M}$ (correspondente ao tratamento controle, que continha algas e a concentração de manganês já presente no meio de cultura CHU-10/2 e sem adição de Cr); $1,45$, $3,64$, $7,28$ e $14,56 \mu\text{M}$. E as seguintes concentrações da exposição ao Cr isolado: $3,84$, $7,68$, $15,36$ e $19,2 \mu\text{M}$. Durante os testes, a concentração inicial de algas foi de 5×10^4 células mL^{-1} , inoculadas na fase exponencial de crescimento em Erlenmeyers de policarbonato de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL das soluções-teste. Essas concentrações foram escolhidas com base em resultados de testes preliminares. Os tratamentos da mistura de Mn e Cr foram realizados com base em um design fatorial completo, resultando em 16 tratamentos dos metais combinados (M1 a M16, descritos em detalhes em nosso estudo anterior: Alho et al., 2022). Os experimentos tiveram duração de 96 horas e continham 3 réplicas por tratamento.

2.2. Determinação dos metais

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, iCAP 7000 Series, Thermo Scientific) foi utilizada para quantificar as concentrações totais de Mn e Cr em todos os tratamentos com os metais isolados e em mistura, bem como a concentração total de Mn no controle. Para tanto, todas as amostras foram acidificadas a 1% HNO_3 e mantidas congeladas a -20 °C até a análise. Os resultados das concentrações de metal nominal x real podem ser encontrados em nosso estudo anterior (Alho et al., 2022). Usamos as

concentrações nominais do metal neste estudo, uma vez que as concentrações medidas e nominais não diferiram em mais de 20% (OECD, 2002).

2.3. Análises no citômetro de fluxo

A densidade celular foi medida todos os dias usando um citômetro de fluxo (FACSCalibur – Becton Dickinson, EUA) (Alho et al., 2019). Os procedimentos para contagem de células seguiram os descritos em Sarmiento et al. (2008), com microesferas fluorescentes (beads) de 6 µM usadas como padrão interno (Polysciences, Inc., Warrington, PA, EUA). As células das microalgas foram identificadas em gráficos de dispersão lateral (SSC-H) *versus* fluorescência vermelha (FL3-H). O cálculo do FL3-H relativo (fluorescência média da *Clo a*) e do FSC-H relativo (tamanho celular relativo) foi realizado de acordo com Mansano et al. (2017) e foram expressos em unidades arbitrárias. O software CellQuest BD foi usado para aquisição dos dados e o software FlowJo v.10 foi usado para análise dos citogramas. As seguintes equações foram usadas para calcular o ROS relativo (%) (Hong et al., 2009):

$$FL1-H_{\text{relativo}} = \log (FL1-H_{\text{amostra}}) / \log (FL1-H_{\text{beads}}) \quad (\text{eq. 1})$$

$$ROS_{\text{relativo}}(\%) = (FL1-H_{\text{relativo}}[\text{tratamento}] / FL1-H_{\text{relativo}}[\text{controle}]) \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

2.4. Quantificação dos compostos de reserva de energia

As medidas dos compostos de reserva de energia foram realizadas para cada réplica do controle e dos tratamentos com Mn e Cr em suas formas isolada e combinada, após 96 hrs de exposição. Os parâmetros quantificados foram carboidratos totais, lipídios totais e composição de classes lipídicas.

2.4.1. Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram quantificados seguindo os procedimentos descritos em Liu et al. (1973), baseado na reação de fenol e ácido sulfúrico. A dextrose anidra (Mallinckrodt Chemicals, EUA) foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração (Fig. S1, Material suplementar). Todas as amostras foram analisadas utilizando-se um espectrofotômetro (HACH DR 5000; HACH Company, Loveland, CO, EUA), em um comprimento de onda de 485

nm. As oito concentrações utilizadas para a curva de calibração com dextrose anidra foram 5, 10, 20, 40, 80, 100, 150 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.2. Lipídios totais e composição de classes lipídicas

Os procedimentos seguidos para extração e quantificação de lipídios totais e classes lipídicas estão descritos em Parrish et al. (1999). Um volume de 120 mL de amostras de algas de cada tratamento e do controle foi filtrado em filtros de fibra de vidro previamente calcinados (400 °C, 8 h) (Macherey-Nagel, Alemanha) e armazenados a -20 °C (<3 dias) em frascos de vidro previamente lavados com metanol e clorofórmio, até a extração. O clorofórmio foi adicionado a cada frasco contendo os filtros antes injeção de fluxo de nitrogênio e os frascos foram armazenados em freezer. A extração foi realizada com clorofórmio: metanol: água lavada com clorofórmio (2:1:1). O processo de lavagem, no qual apenas clorofórmio foi adicionado à amostra, foi repetido três vezes. Para a extração e lavagem, as amostras foram sonicadas por 5 min (Unique Group, Indaiatuba, Brasil), seguido de 2 min de centrifugação a 3000 rpm (Eppendorf 5702 R, Alemanha). A etapa seguinte foi a concentração de cada amostra para um volume final de 0,5 mL usando um evaporador rotativo (RV05 S25, IKA, Alemanha). As classes lipídicas foram identificadas e quantificadas utilizando-se o equipamento Iatroscan MK6 (Mitsubishi, Kagaku Iatron Inc., Tóquio, Japão), que consiste em cromatografia em camada fina com detecção por ionização em chama (TLC/FID). As condições analíticas para as análises em TLC-FID foram: fluxo de hidrogênio 173 mL min⁻¹, fluxo de ar 2 L min⁻¹ e velocidade de varredura 4 mm s⁻¹ (Rocha et al., 2016). Nove classes lipídicas foram utilizadas para preparar uma curva de calibração de padrão lipídico misto (Sigma-Aldrich, EUA): hidrocarboneto alifático (HC), éster de cera/éster estearílico (WE/SE), cetona (KET), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (FFA), álcool alifático (ALC), esterol livre (ST), lipídios polares móveis em acetona (AMPL) e fosfolipídios (PL), embora nem todos tenham sido identificados nas amostras. As áreas dos picos foram registradas e processadas com o auxílio do software PeakSimple (versão 4.444).

2.5. Análises estatísticas

As concentrações de inibição resultantes da exposição ao Mn e ao Cr(III) foram determinadas utilizando-se a TRC após 96 hrs de exposição, por regressão não linear com uma curva logística sigmoideal de três parâmetros (SigmaPlot 11.0, Systat, 2008). Os dados foram

analisados utilizando-se One Way ANOVA, seguido de testes post-hoc de Dunnett quando os resultados apresentaram distribuição normal. Os resultados de distribuição não normal ou variância desigual foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis e o teste não paramétrico de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas no software SigmaPlot versão 11.0 (Systat, 2008).

Foram calculados os efeitos preditos e observados da combinação de Mn e Cr para determinar se a combinação dos metais causa sinergismo (efeitos mais severos) ou antagonismo (efeitos menos severos) nas respostas algal de produção de carboidratos totais e lipídios totais, de acordo com os procedimentos descritos em Gottardi et al. (2017). Para isso, foi calculada a razão entre o efeito predito e o efeito observado. As interações sinérgicas ou antagônicas entre Mn e Cr foram consideradas onde os endpoints das microalgas expostas à mistura foram significativamente menores ou maiores ($p < 0,05$) do que os endpoints das microalgas do grupo controle e expostas a qualquer um dos dois compostos isolados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados brutos de TRC, FL3-H relativo, FSC-H relativo, ROS relativo, carboidratos totais, lipídios totais e composição das classes lipídicas estão apresentados nas Tabelas S1, S2, S3 e S4 (Material suplementar).

Os resultados dos valores de IC_{50} revelaram que o Mn foi mais tóxico que o Cr para *R. subcapitata*, com uma $IC_{50-96 \text{ hrs}}$ de $4,96 \pm 0,51 \mu\text{M}$ ($0,27 \pm 0,03 \text{ mg Mn L}^{-1}$) para Mn e um $IC_{50-96 \text{ hrs}}$ de $16,55 \pm 10,28 \mu\text{M}$ ($0,86 \pm 0,53 \text{ mg Cr L}^{-1}$) para exposição ao Cr. Todas as concentrações de Mn levaram à inibição do crescimento de algas (Fig.1A). Quanto maior a concentração do metal, maior o efeito negativo sobre a TRC, atingindo a maior inibição em $14,56 \mu\text{M}$ (81,1%). O Cr, por outro lado, promoveu estímulo do crescimento nas concentrações mais baixas ($3,84$ e $7,68 \mu\text{M}$), atingindo um aumento de 169,2% em $7,68 \mu\text{M}$, e não alterou significativamente (teste de Dunnett, $p > 0,05$) a TRC da microalga nas concentrações mais altas ($15,36$ e $19,2 \mu\text{M}$) (Fig. 1B). Em *Micrasterias denticulata* exposta a 5 e 10 μM de Cr(III), as taxas de divisão celular não diferiram significativamente dos níveis do controle (Volland et al., 2012). Baixas concentrações de produtos químicos, incluindo metais, podem estimular o crescimento e os parâmetros fisiológicos dos organismos, o que é conhecido como efeito de hormese (Rand, 1995). A hormese se caracteriza como uma adaptação de células e organismos a uma condição de estresse

intrínseco ou imposto, onde o sistema aumenta sua capacidade ou tolerância para lidar com desafios mais severos (Calabrese e Mattson, 2017).

O Cr(III) tende a formar complexos com hidróxidos (Rai et al., 1989). Corroborando esse fato, o Cr foi dissociado como Cr(OH)^{2+} (89%), Cr(OH)_2^+ (7,3%) e $\text{Cr(OH)}_{3(\text{aq})}$ (3,4%) no meio de cultivo CHU 10/2, conforme descrito em nosso estudo anterior (Alho et al., 2022). O Mn, em contrapartida, tem uma fraca tendência a formar complexos orgânicos (Knauer et al., 1999), como confirmado pelos resultados do nosso estudo anterior, onde a maior parte do Mn adicionado foi dissociado como Mn^{2+} (96,8%) (Alho et al., 2022). A alta afinidade do Cr(III) com orgânicos resulta na formação de complexos que precipitam como hidróxidos amorfos (Cheung e Gu, 2007) e explica a menor toxicidade do Cr em comparação ao Mn em no presente trabalho.

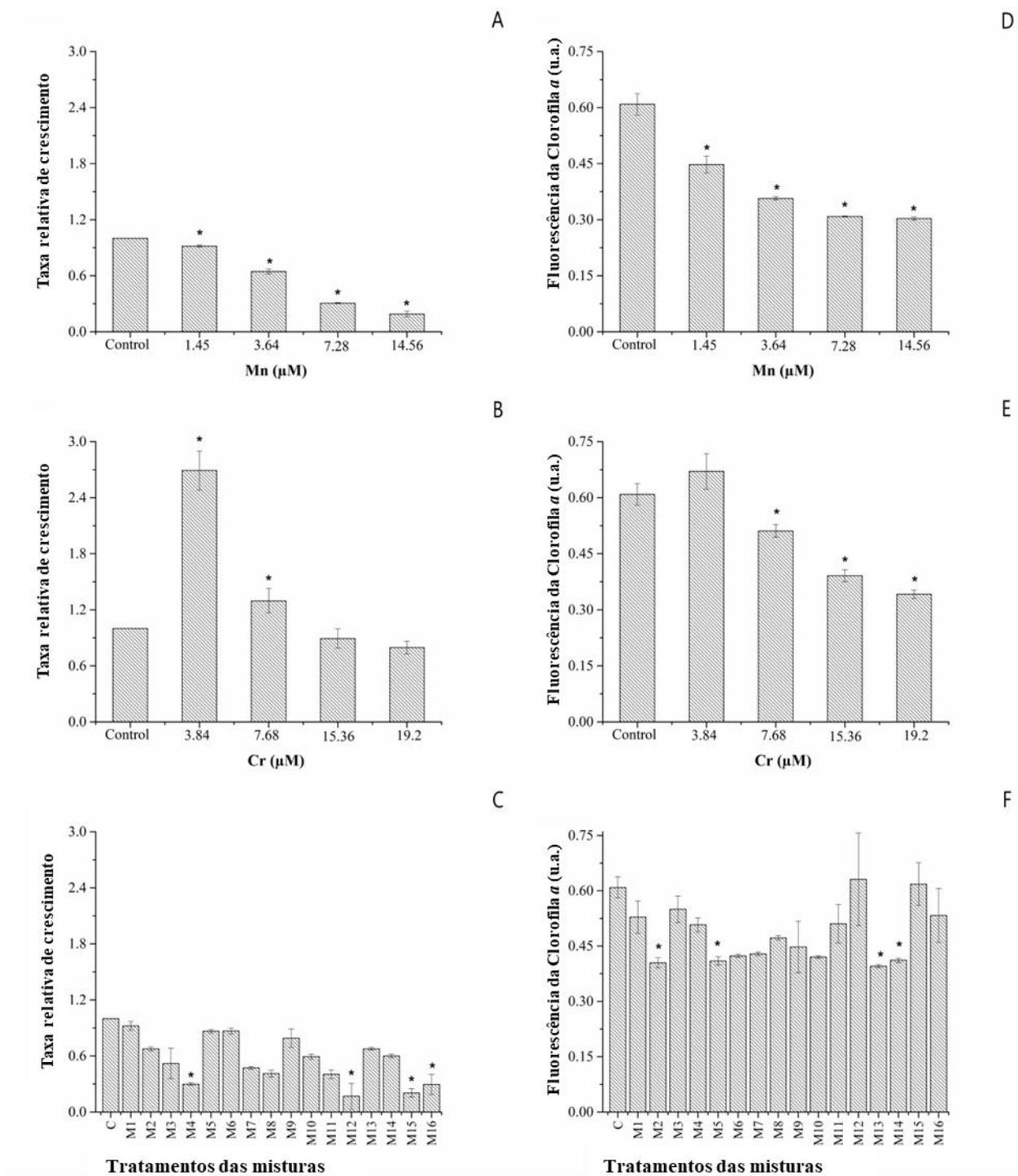


Fig.1: Curvas de crescimento (média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* ($\times 10^4$ cels mL^{-1}) exposta ao manganês (A) e ao cromo (B) a longo de 72 hrs, e densidade de células ($\times 10^4$ cels mL^{-1}) após 72 hrs de exposição à mistura binária dos metais (C). O grupo controle está representado pela letra C e as concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferença significativa dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

Em relação aos efeitos da mistura dos metais, a combinação da concentração mais baixa de Mn e a concentração mais alta de Cr (M4: 1,45 μM Mn x 19,2 μM Cr) levou a uma inibição da TRC de 70,2% (Fig. 1C). Além disso, a concentração mais alta de Mn (14,56 μM) combinada com as maiores concentrações de Cr (15,36 e 19,2 μM), ou seja, os tratamentos M15 e M16, também inibiram o crescimento das algas (79,7 e 70,5%, respectivamente). Mas a inibição mais significativa foi causada pela combinação de 7,28 μM de Mn com 19,2 μM de Cr (83,2%). O Cr(III) intracelular pode ser sequestrado por grupos fosfato do DNA, o que pode acabar afetando a replicação, a transcrição e até mesmo causando mutagênese (Cervantes et al., 2001). Apesar disso, as concentrações de Cr(III) utilizadas em nosso estudo não levaram a alterações negativas na TRC das algas durante a exposição ao Cr isolado. Isso pode sugerir que a redução significativa dos valores de TRC em alguns tratamentos de mistura (M4, M12, M15 e M16) foi principalmente devido aos efeitos do Mn.

Seguindo a tendência de redução do teor de Clo *a* em algumas clorofíceas expostas a metais (Carfagna et al., 2013; Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015) e apresentando o mesmo padrão de resposta da TRC, a fluorescência da Clo *a* diminuiu progressivamente em resposta a concentrações crescentes de Mn (Fig. 1D). O Mn pode se ligar a ferredoxinas ligadas à membrana no estroma dos tilacóides e deslocar o Mg^{2+} da molécula de Clo *a*, danificando-a (Hauck et al., 2003). Isso explica a redução progressiva da fluorescência média da Clo *a* sob exposição ao Mn no nosso estudo. Com exceção de 3,84, todas as demais concentrações de Cr também reduziram esse parâmetro, chegando a 43,9% a 19,2 μM (Fig. 1E). A diminuição dos níveis de Clo *a* em plantas expostas ao Cr tem sido atribuída à redução da atividade da δ -aminolevulínico desidratase (ALAD), uma enzima relacionada à biossíntese de Clo (Vajpayee et al., 2000), e isso pode explicar a redução da fluorescência média da Clo *a* das células de *R. subcapitata* tratadas com Cr em nosso estudo, devido à capacidade que este metal apresenta em deslocar o Mg no sítio ativo da ALAD (Vajpayee et al., 2000).

Apesar da diminuição da fluorescência média da Clo *a* em todas as concentrações de Mn e da maioria das concentrações de Cr durante sua única exposição, a combinação de ambos os metais não afetou este parâmetro, pois apenas quatro (M2, M5, M13 e M14) dos 16 tratamentos de mistura causou uma diminuição significativa na fluorescência da Clo *a* nas células de algas.

Nem o Mn nem o Cr causaram redução no tamanho celular relativo das algas (Fig. 2A,B), o que era esperado para as algas expostas ao Cr, pois não houve inibição do crescimento após 96

hrs de tratamento com este metal. Este resultado, no entanto, foi surpreendente com relação a exposição ao Mn, uma vez que células com atraso ou comprometimento no processo de divisão celular tendem a formar células maiores, o que provavelmente é uma resposta da célula algal para reduzir a razão superfície/volume na tentativa de sobreviver em uma condição estressante. (Echeveste et al., 2017; Rocha et al., 2016; Silva et al., 2018). Apesar disso, Christensen e Scherfig (1978) não encontraram alteração no volume celular de *R. subcapitata* (também chamada de *Selenastrum capricornutum*) após exposição ao Mn.

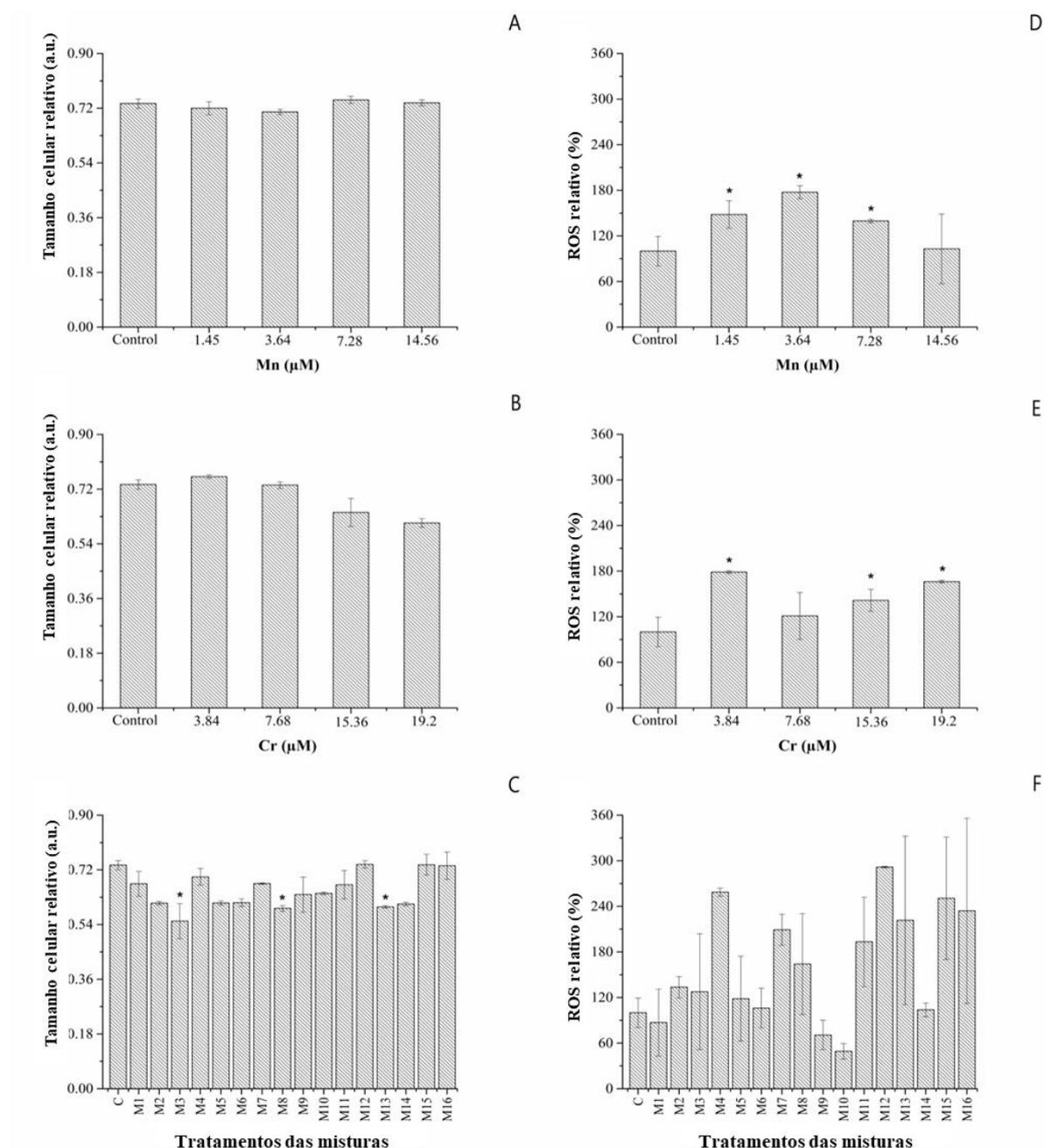


Fig.2: Tamanho celular relativo (FSC-H relativo) (A, B, C; média ± DP) e espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species* - ROS) (D, E, F; média ± DP) da microalga *Raphidocelis*

subcapitata após 96 horas de exposição ao manganês (A,D) e ao cromo (B,E) e à mistura binária dos metais (C, F). Tratamentos M1 a M16 se referem às soluções-teste com a mistura de Mn e Cr; C = grupo controle. As concentrações dos metais estão expressas em μM . O símbolo * representa diferenças significativas dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

O dano oxidativo está frequentemente relacionado à toxicidade de metais pesados, uma vez que a produção de ROS pode oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando à morte celular ou ao desligamento de toda a maquinaria celular (Rodríguez et al., 2007). O Cr é conhecido por estimular a formação de ROS (Kováčik et al., 2015). Em *Chlamydomonas reinhardtii*, a produção de ROS devido à toxicidade do Cr causou danos a compostos celulares, como os lipídios dos tilacóides (Rodríguez et al., 2007). Apesar disso, em nosso estudo anterior observamos que a produção de ROS por *R. subcapitata* não foi motivo da toxicidade do Cr quando os efeitos desse metal foram avaliados por 72 hrs (Alho et al., 2022). Mas com base nos resultados do presente estudo, quando o tempo de exposição foi aumentado para 96 hrs, o Cr induziu a formação de ROS nas células das algas (Fig. 2E). Ainda assim, o ROS não foi a principal razão para a toxicidade do Cr, pois a TRC não foi reduzida em nenhuma concentração em resposta à exposição a este metal por 96 hrs.

Observamos redução do teor de carboidratos intracelulares nas células expostas a todas as concentrações de Mn e Cr isolados, exceto para $1,45 \mu\text{M}$ de Mn (Fig. 3A,B). As concentrações mais altas de Mn ($14,56 \mu\text{M}$) e Cr ($19,2 \mu\text{M}$) levaram a uma redução de 49,5% e 37,9% dos carboidratos totais, respectivamente. A concentração de Cr de $15,36 \mu\text{M}$ diminuiu este nível de composto de reserva de energia em 72%. A combinação de ambos os metais levou a uma diminuição deste parâmetro em quase todos os tratamentos da mistura, atingindo um valor máximo de 60,1% de redução no tratamento com a combinação das menores concentrações dos dois metais (M1: $1,45 \mu\text{M}$ de Mn x $3,84 \mu\text{M}$ de Cr) (Fig. 3C). Apesar disso, os tratamentos de mistura da concentração mais alta de Mn ($14,56 \mu\text{M}$) com as concentrações mais altas de Cr ($15,36$ e $19,2 \mu\text{M}$), i. e., M15 e M16, não levaram a alteração significativa deste parâmetro bioquímico em comparação com o controle. Além disso, o tratamento M12 ($7,28 \mu\text{M}$ de Mn x $19,2 \mu\text{M}$ de Cr) levou a um aumento nos níveis de carboidratos de 117,3%, que foi o tratamento com menor TRC (83% menor que o controle), devido aos efeitos de inibição do crescimento causados pelos metais (Fig. 1C), o que pode sugerir uma tentativa das algas em diminuir os efeitos adversos dos compostos. O efeito negativo da exposição à mistura de Mn e Cr sobre os

níveis de carboidratos de *R. subcapitata* foi 7,1% maior do que o previsto no tratamento M1 (combinado as concentrações mais baixas de ambos os metais) (Tabela 1). Todos os outros tratamentos de mistura que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$, One-Way ANOVA) do controle ou da exposição ao metal isolados tiveram efeitos antagônicos na produção dessa biomolécula.

Tem sido reportado na literatura o aumento do teor de carboidratos em células de algas sob estresse por metal (Alho et al., 2020; Chia et al., 2015; Silva et al., 2018), uma vez que essas biomoléculas fornecem energia para manter o processo metabólico e a integridade da parede celular (Markou et al., 2012). Portanto, carboidratos intracelulares que têm seus níveis elevados em resposta ao estresse metálico podem ser um mecanismo de defesa para diminuir a biodisponibilidade do metal ou para proteger a parede celular (Silva et al., 2018), devido a interações entre as cargas negativas das moléculas de carboidratos com os cátions metálicos (Silva et al. Kaplan et al., 1987). Em nosso estudo, o teor reduzido de carboidratos em resposta ao Mn e Cr pode indicar que esse mecanismo de defesa foi prejudicado, e a produção dessa biomolécula foi afetada negativamente pelos metais. Além disso, a produção de Clo *a* é utilizada pelas algas para fixação de CO₂ e alocação de carbono para açúcar e carboidratos (Chia et al., 2015). Portanto, os valores reduzidos de fluorescência da Clo *a* de *R. subcapitata* em resposta ao Mn e ao Cr podem ter influenciado a diminuição do teor de carboidratos nas células algais.

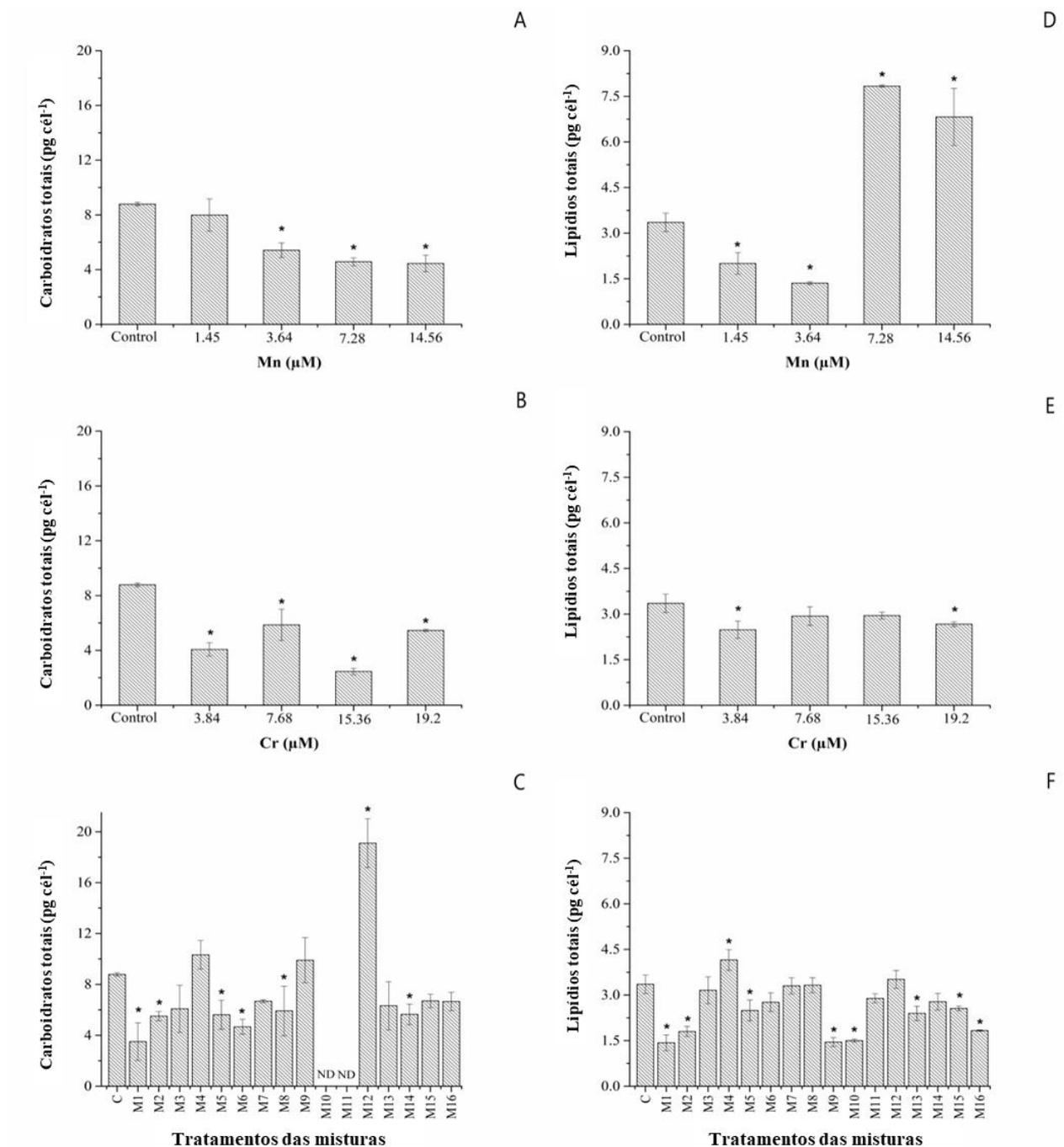


Fig.3: Medidas de carboidratos totais (A, B, C; média ± DP) e lipídios totais (D, E, F; média ± DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* após 96 hrs de exposição ao manganês (A,D) e ao cromo (B,E) e à mistura binária dos metais (C, F). Tratamentos M1 à M16 se referem às soluções-teste com a mistura de Mn e Cr; C = grupo controle. As concentrações dos metais estão expressas em μM. O símbolo * representa diferenças significativas dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

O teor de lipídios totais apresentou alteração nas células de *R. subcapitata* expostas a todas as concentrações de Mn, o que destaca a importância de se utilizar análises mais aprofundadas além das tradicionais (crescimento, níveis de pigmentação e viabilidade celular) (Reis et al., 2021). O teor de lipídios totais produzido em células de algas expostas a 7,28 e 14,56 μM de Mn foi 133,6% e 103,4% maior, respectivamente, que no controle (Fig. 3D), enquanto 1,45 e 3,64 μM de Mn reduziram os lipídios em cerca de 40,3% e 59,9%, respectivamente. Apenas a concentração mais baixa (3,84 μM) e a mais alta de Cr (19,2 μM) alteraram o conteúdo lipídico total da microalga, reduzindo-o em 26% e 20,4%, respectivamente (Fig. 3B). Os lipídios podem combater os danos causados pelo estresse oxidativo atuando como um dissipador de elétrons (Chia et al., 2015). É por isso que o aumento da produção de lipídios tem a capacidade de reduzir a geração de ROS em microalgas sob estresse metálico (Alho et al., 2019; Chia et al., 2015; Hu et al., 2008), o que foi confirmado pelo nosso estudo: as concentrações Mn com maiores teores de lipídios totais (7,28 e 14,56 μM) foram as que apresentaram menor produção de ROS (Fig. 2D), assim como a menor produção de lipídios em comparação ao controle ocorreu nas concentrações onde encontramos maior geração de ROS em resposta a Mn (Fig. 2D). Além disso, o aumento da produção de ROS ocorreu em concentrações de Cr com menor produção de lipídios do que no controle (3,84 e 19,2 μM , Fig. 2E).

Em relação à mistura binária dos metais, vários tratamentos levaram a uma diminuição no teor de lipídios (Fig. 3F), com a diminuição máxima de 56,8% e 55,3% nos tratamentos M9 e M10, respectivamente (7,28 μM de Mn x 3,84 e 7,68 μM de Cr, respectivamente). Apenas o tratamento M4 (correspondente à menor concentração de Mn, 1,45 μM , combinado com a maior concentração de Cr, 19,2 μM) aumentou os níveis lipídicos em relação ao controle. O impacto negativo do Mn e Cr combinados na produção de lipídios de *R. subcapitata* foi superior ao predito em cerca de 4,5%, 75%, 77%, 57% e 66,7% nos tratamentos M1 (0,08 μM Mn x 0,20 μM Cr), M9 (0,40 μM Mn x 0,20 μM Cr), M10 (0,40 μM Mn x 0,40 μM Cr), M15 (0,80 μM Mn x 0,80 μM Cr) e M16 (0,80 μM Mn e 1,00 μM Cr), respectivamente (Tabela 1). Todos os outros tratamentos da mistura que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$, One-Way ANOVA) do controle ou da exposição ao metal isolado tiveram efeitos antagônicos na produção de lipídios totais das microalgas.

Tabela 1: Valores de carboidratos totais e lipídios totais (pg cel^{-1} ; média \pm DP) da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à mistura de manganês (Mn) e cromo (Cr). Somente os

resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$, One-Way ANOVA) em comparação com o controle ou com os metais isolados estão apresentados abaixo. Interações sinérgicas (S) foram assumidas quando os efeitos observados foram menores que os efeitos preditos, e interações antagônicas (A) foram assumidas quando os efeitos observados foram maiores que os efeitos preditos.

Mn (μM)	Cr (μM)	Carboidratos totais				Dados modelados		
		Controle	Manganês	Cromo	Mistura	Predito	Observado	Efeito
1,45	3,84	8,79 \pm 0,13	7,99 \pm 1,18	4,06 \pm 0,47	3,50 \pm 1,47	0,42	0,39	S
1,45	7,68	8,79 \pm 0,13	7,99 \pm 1,18	5,86 \pm 1,13	5,51 \pm 0,35	0,6	0,63	A
1,45	19,2	8,79 \pm 0,13	7,99 \pm 1,18	5,45 \pm 0,08	10,32 \pm 1,12	0,56	1,17	A
3,64	3,84	8,79 \pm 0,13	5,42 \pm 0,54	4,06 \pm 0,47	5,61 \pm 1,13	0,28	0,64	A
3,64	7,68	8,79 \pm 0,13	5,42 \pm 0,54	5,86 \pm 1,13	4,67 \pm 0,57	0,41	0,53	A
3,64	19,2	8,79 \pm 0,13	5,42 \pm 0,54	5,45 \pm 0,08	5,92 \pm 1,94	0,38	0,67	A
7,28	3,84	8,79 \pm 0,13	4,57 \pm 0,28	4,06 \pm 0,47	9,90 \pm 1,75	0,31	1,13	A
7,28	19,2	8,79 \pm 0,13	4,57 \pm 0,28	5,45 \pm 0,08	19,09 \pm 1,92	0,41	2,17	A
14,56	7,68	8,79 \pm 0,13	4,45 \pm 0,60	5,86 \pm 1,13	5,64 \pm 0,80	0,18	0,64	A
Mn (μM)	Cr (μM)	Lipídios totais				Dados modelados		
		Controle	Manganês	Cromo	Mistura	Predito	Observado	Efeito
1,45	3,84	3,35 \pm 0,30	2,00 \pm 0,35	2,48 \pm 0,28	1,43 \pm 0,26	0,44	0,42	S
1,45	7,68	3,35 \pm 0,30	2,00 \pm 0,35	2,93 \pm 0,30	1,80 \pm 0,16	0,52	0,54	A
1,45	19,2	3,35 \pm 0,30	2,00 \pm 0,35	2,67 \pm 0,07	4,15 \pm 0,34	0,47	1,24	A
3,64	3,84	3,35 \pm 0,30	1,35 \pm 0,04	2,48 \pm 0,28	2,49 \pm 0,34	0,3	0,74	A
7,28	3,84	3,35 \pm 0,30	7,83 \pm 0,03	2,48 \pm 0,28	1,45 \pm 0,15	1,72	0,43	S
7,28	7,68	3,35 \pm 0,30	7,83 \pm 0,03	2,93 \pm 0,30	1,50 \pm 0,05	2,04	0,47	S
14,56	3,84	3,35 \pm 0,30	6,82 \pm 0,93	2,48 \pm 0,28	2,77 \pm 0,27	0,17	0,72	A
14,56	15,36	3,35 \pm 0,30	6,82 \pm 0,93	2,95 \pm 0,11	2,55 \pm 0,07	1,79	0,76	S
14,56	19,2	3,35 \pm 0,30	6,82 \pm 0,93	2,67 \pm 0,07	1,83 \pm 0,01	1,62	0,54	S

Mn e Cr causaram diferentes respostas na composição de classes lipídicas de *R. subcapitata*. A exposição ao Mn apresentou uma tendência em aumentar os níveis da maioria das classes identificadas (Fig. 4). As concentrações mais baixas de Mn (1,45 e 3,64 μM) inibiram significativamente o teor de KET (Fig. 4B) em mais de 91% e diminuíram os níveis de AMPL em 28,6 e 31,0%, respectivamente. Os níveis de TAG também foram reduzidos em 1,45 μM (47,6%). As maiores concentrações de Mn (7,28 e 14,56 μM) aumentaram os níveis de HC (163,3% e 234,3%, respectivamente), KET (319,7% e 91,3%, respectivamente), FFA (33,4% e

434,9%, respectivamente), ST (105,5 % e 146,7%, respectivamente), AMPL (13,5% e 42,2%, respectivamente) e PL (471,2% e 635,1%, respectivamente). Em relação à composição das classes lipídicas em % de lipídios totais (Fig. 4H), as principais alterações ocorreram na classe dos TAG (reduziu de 32,2% no controle para 11,1% na concentração mais alta), AMPL (alterou de 27,4% no controle para 50,5% no 3,64 μM e para 19,2% a 14,56 μM) e PL (aumentou de 6,1% no controle para mais de 21% em 7,28 e 14,56 μM).

Algumas classes lipídicas, como HC, FFA e ST, geralmente são encontradas em quantidades inferiores a 10% em células de algas saudáveis (Guschina e Harwood, 2006; Lombardi e Wangersky, 1991), o que foi confirmado por nossos resultados (Fig. 4H ; Fig. 5H). No entanto, o estresse causado pelo metal pode induzir alteração em suas proporções, como encontrado por Reis et al. (2021) ao expor *R. subcapitata* ao Cd e Co e por Chia et al. (2013) ao expor *C. vulgaris* ao Cd. O aumento de FFA também foi relatado para esta mesma espécie de alga sob exposição ao Cd e Pb (Alho et al., 2019). Sabe-se que AMPL é uma classe de lipídios relacionada a pigmentos (Lombardi e Wangersky, 1991). Portanto, o aumento desta classe lipídica nas concentrações mais altas de Mn foi uma resposta inesperada das células das algas.

A exposição ao Cr levou à redução das classes lipídicas analisadas, exceto PL e FFA (Fig. 5). Os níveis de KET reduziram em mais de 96,9% nas concentrações mais baixas de Cr (3,84 e 7,68 μM), enquanto as mais altas (15,36 e 19,2 μM) diminuíram o teor de TAG em 55 e 39,8%, respectivamente. As concentrações de 3,64 e 15,36 μM de Cr reduziram os níveis de HC em 63,0 e 44,0%, respectivamente, e todas as concentrações de Cr induziram uma redução na produção de ST. Os níveis de PL aumentaram em todas as concentrações, atingindo valores máximos 587,2% e 405,2% superiores ao controle em 15,36 e 19,2 μM , respectivamente. As classes lipídicas em % de lipídios totais (Fig. 5H) mostraram que a % de KET diminuiu de 15,1% nas células do controle para cerca de 0,5% nas concentrações mais baixas de Cr (3,84 e 7,68 μM). O TAG reduziu de 32,2% no controle para 19,7% em 19,2 μM de Cr. Os níveis de PL aumentaram de 6,1% nas células do controle para 49,2 e 25,2% em 15,36 e 19,2 μM de Cr, respectivamente. AMPL pode conter 35-50% de clorofila (Lombardi e Wangersky, 1991), e a redução da fluorescência média de Clo *a* das células de algas sob estresse por Cr pode estar relacionada ao teor reduzido de AMPL nas concentrações de 7,68 e 15,36 μM .

Entre as classes lipídicas afetadas pela maior concentração de Mn, as alterações mais significativas ocorreram em PL, seguidas de FFA e HC. Em relação à exposição ao Cr, a concentração que causou as maiores alterações foi 15,36 μM , afetando a maioria dos níveis de

PL, seguido de AMPL e TAG. Nossos resultados não estão de acordo com os achados de Chia et al. (2015), que relataram níveis mais elevados de TAG em *Chlorella vulgaris* exposta ao Cd. O acúmulo de TAG sob estresse por metal tem sido sugerido como um mecanismo de defesa devido à otimização de uma rápida reorganização adaptativa da membrana (Chia et al., 2015; Sharma et al., 2012), e porque essa classe de lipídios neutros tem uma função de armazenamento de energia (McLarnon- Riches et al., 1998). O Mn não alterou significativamente o conteúdo de TAG nas concentrações mais altas (7,28 e 14,56 μM). Ainda assim, as maiores concentrações de Cr diminuíram o teor dessa classe lipídica, indicando danos a esse mecanismo de proteção.

Uma membrana danificada pode facilitar a internalização de metal na célula (Alho et al., 2020) e, portanto, aumentar os níveis de lipídios da membrana pode ser uma estratégia para proteger as células algais através do aumento da espessura ou fluidez de sua membrana para reduzir a toxicidade do metal (Rocha et al., 2016). Tanto o Mn quanto o Cr induziram níveis elevados de ST e PL, que são classes lipídicas relacionadas à membrana celular. Isso sugere um investimento das algas para manter a integridade da membrana e é provavelmente um mecanismo de defesa para lidar com os efeitos negativos e reduzir a internalização dos metais. O aumento na quantidade de lipídios estruturais e alteração da composição das classes lipídicas em resposta ao estresse metálico já foi observado em *Selenastrum gracile* exposta ao cobre (Rocha et al., 2016) e em *R. subcapitata* exposta ao Pb (Alho et al., 2019), Co (Reis et al., 2021) e Cd (Alho et al., 2019; Reis et al., 2021). As células de algas expostas às concentrações mais altas de Mn (7,28 e 14,56 μM) mudaram suas vias bioquímicas para produzir mais lipídios, principalmente as classes lipídicas estruturais (PL e ST), provavelmente na tentativa de reduzir o impacto negativo do metal, o que foi confirmado pela menor aumento na produção de ROS nessas mesmas concentrações.

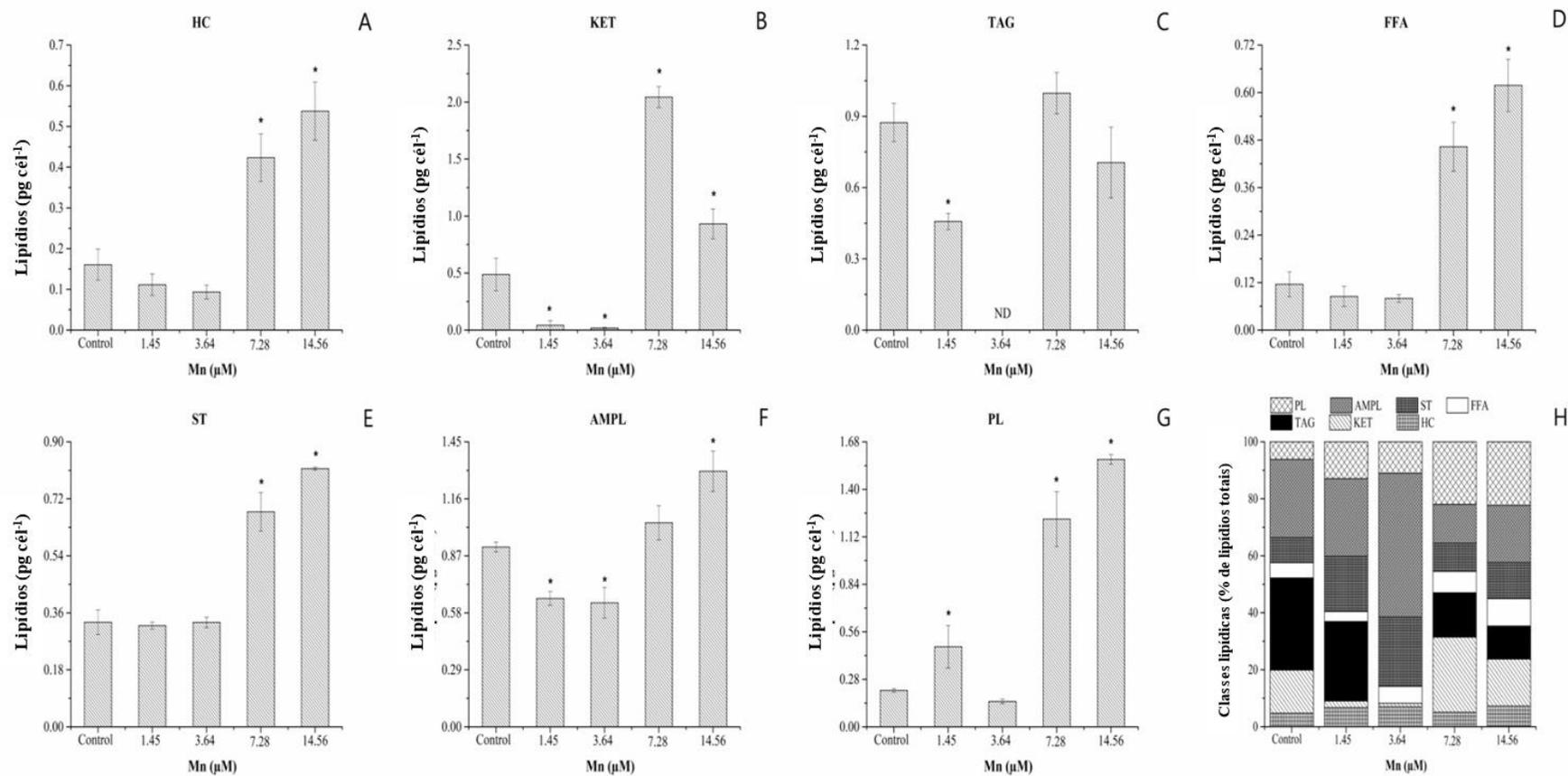


Fig.4: Composição de classes lipídicas individuais (pg cell⁻¹) (A to G) e em porcentagem de lipídios totais (H) da microalga *Rhapidocelis subcapitata* após 96 hrs de exposição ao Mn na forma isolada. As classes lipídicas são HC (A – hidrocarbonetos alifáticos), KET (B – cetona), TAG (C – triacilgliceróis), FFA (D – ácidos graxos livres), ST (E – ácidos graxos livres), AMPL (F – lipídios polares móveis em acetona) and PL (G – fosfolipídios). ND significa não detectado. As concentrações de Mn estão expressas em μM. O símbolo * representa diferenças significativas dos tratamentos quando comparados ao grupo controle (p < 0.05).

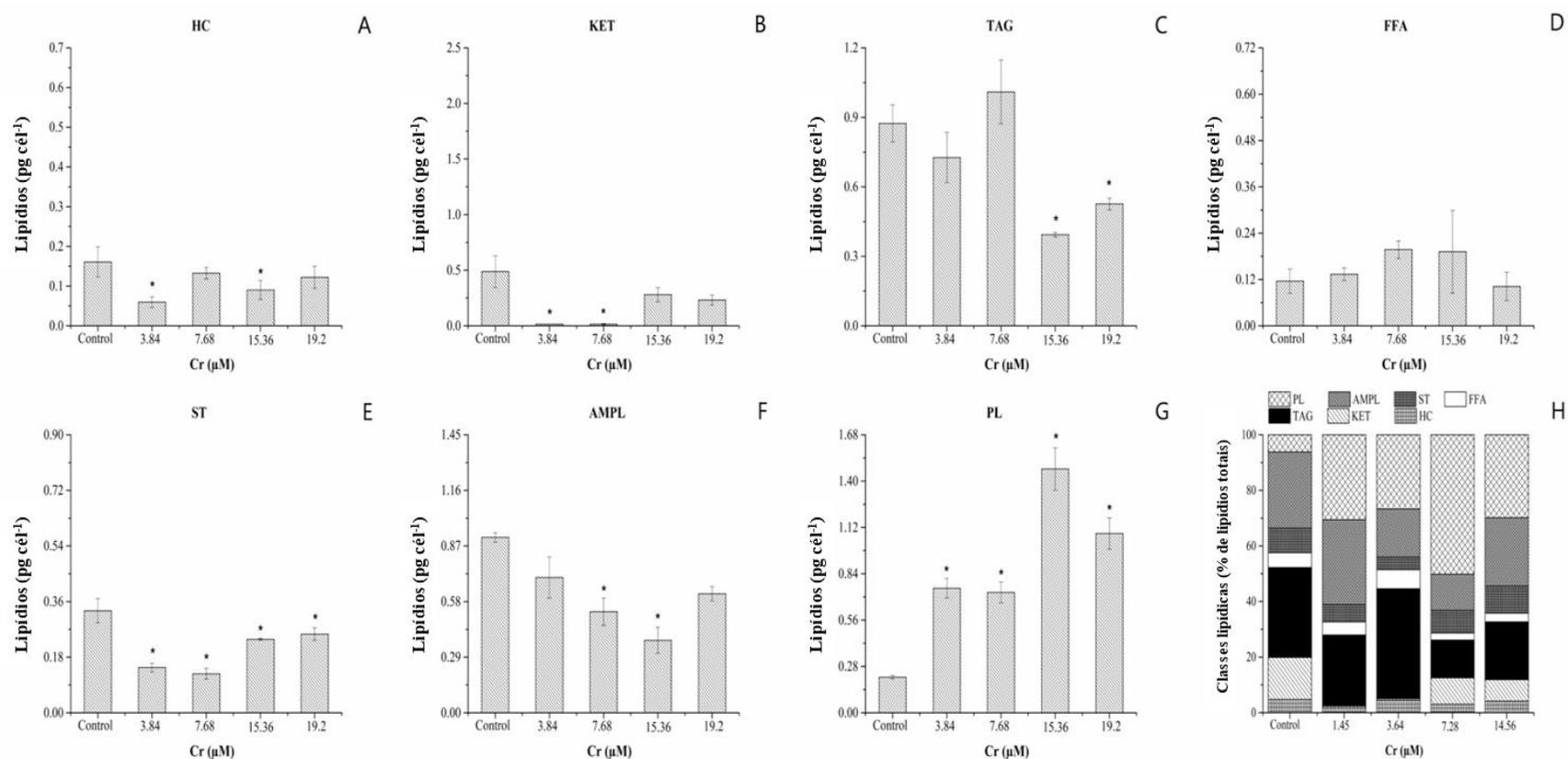


Fig.5: Composição de classes lipídicas individuais (pg cell⁻¹) (A to G) e em porcentagem de lipídios totais (H) da microalga *Rhapidocelis subcapitata* após 96 hrs de exposição ao Cr na forma isolada. As classes lipídicas são HC (A – hidrocarbonetos alifáticos), KET (B – cetona), TAG (C – triacilgliceróis), FFA (D – ácidos graxos livres), ST (E – ácidos graxos livres), AMPL (F – lipídios polares móveis em acetona) and PL (G – fosfolipídios). ND significa não detectado. As concentrações de Cr estão expressas em μ M. O símbolo * representa diferenças significativas dos tratamentos quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

De um modo geral, a maioria das classes lipídicas apresentou teores aumentados em resposta a exposição ao Mn, enquanto a maioria deles teve seu nível reduzido em resposta à exposição ao Cr. As alterações bioquímicas que encontramos neste trabalho em relação às quantidades e composição dos compostos de reserva energética das algas em resposta aos metais podem representar riscos para os ecossistemas aquáticos, uma vez que essas alterações podem afetar os valores nutricionais das microalgas e alterar a quantidade e/ou qualidade da energia transferida para os consumidores desses organismos (Alho et al., 2020).

4. CONCLUSÃO

Há pouca informação sobre a toxicidade do Mn para organismos aquáticos, mas a maior parte da literatura disponível sugere que este metal tem baixos efeitos tóxicos em comparação com vários outros metais pesados (Biesinger e Christensen, 1972; Fargašová et al. ., 1997). Apesar disso, a exposição ao Mn isolado inibiu o crescimento de *R. subcapitata* após 96 hrs. As concentrações mais baixas de Cr levaram ao estímulo do crescimento algal e, portanto, o Mn apresentou maior toxicidade do que o Cr. A fluorescência da Clo *a* foi diminuída por ambos os metais em suas formas isoladas, mas os tratamentos da mistura não alteraram este parâmetro. A produção de ROS aumentou nas concentrações de Mn isolado que tinham menor teor de lipídios em comparação com o controle. As concentrações mais altas de Mn induziram aumento da produção de lipídios, provavelmente como um mecanismo de defesa para diminuir os níveis de ROS dentro das células. O nível de carboidratos totais foi reduzido em resposta a ambos os metais, e os tratamentos da mistura mostraram efeitos antagônicos em quase todas as concentrações combinadas de Mn e Cr para este parâmetro. A combinação das concentrações mais altas de ambos os metais levou a efeitos sinérgicos no teor de lipídios, embora as concentrações intermediárias dos tratamentos da mistura tenham levado à uma variação entre efeitos sinérgicos e antagônicos. A composição das classes lipídicas revelou respostas diferentes em relação à exposição a cada metal. Em geral, o Mn induziu aumento de HC, KET, FFA, ST e AMPL, enquanto a exposição ao Cr diminuiu as concentrações de TAG, ST e AMPL. Os dois metais levaram a um aumento no teor de PL, possivelmente para manter a integridade da membrana, reduzindo a internalização do metal e os seus efeitos negativos.

É comum que os produtos químicos tenham um local e/ou modo de ação em baixas concentrações e outros em concentrações mais altas (Cedergreen et al., 2008). Em baixas concentrações de Mn, observamos aumento da geração de ROS e redução dos níveis de lipídios

totais. Mas em doses mais altas, o Mn aumentou o teor de lipídios em relação ao controle e reduziu o aumento da formação de ROS em comparação com as concentrações mais baixas. Esse padrão também ocorreu em relação às classes lipídicas KET e AMPL (redução nas menores concentrações e aumento nas maiores).

5. REFERÊNCIAS

- Alho, L. O. G., Gebara, R. C., Paina, K. A., Sarmiento, H., Melão, M. G. G., 2019. Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 950-959.
- Alho, L. O. G., Souza, J. P., Rocha, G. S., Mansano, A. S., Lombardi, A. T., Sarmiento, H., Melão, M. G. G., 2020. Photosynthetic, morphological and biochemical biomarkers as tools to investigate copper oxide nanoparticle toxicity to a freshwater chlorophyceae. *Environ. Pol.* 265, 114856.
- Bakshi, A., Panigrahi, A. K., 2018. A comprehensive review on chromium induced alterations in fresh water fishes. *Toxicology Reports*, 440-447.
- Barnhart, J., 1997. Chromium Chemistry and Implications for Environmental Fate and Toxicity. *J. Soil Contam.* 6(6), 561-568.
- Bashir, K., M., I., Lee, H-J., Mansoor, S., Jahn, A., Cho, M-G., 2021. The Effect of Chromium on Photosynthesis and Lipid Accumulation in Two Chlorophyte Microalgae. *Energies* 14, 2260.
- Biesinger, K. E., Christensen, G. M., 1972. Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 29, 1691-1700.
- Calabrese, E. J., Mattson, M. P., 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *Aging Mech. Dis.* 3, 13.
- Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., Vona, V., 2013. Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *SpringerPlus* 2, 147.
- Cedergreen, N., Christensen, A. M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(7), 1621-1632.

- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (3), 335-347.
- Cheung, K. H., Gu, J-D, 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59, 8-15.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., Parrish, C. C., 2013. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. *Aquat. Toxicol.* 128, 171-182.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., Parrish, C. C., 2015. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Aquat. Toxicol.* 160, 87-95.
- Christensen, E. R., Scherfig, J., 1978. Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella stigmatophora*. *Water Reser.* 11, 79-92.
- Couillard, Y., 1989. Acute Toxicity of Six Metals to the Rotifer *Brachionus calyciflorus*, with Comparisons to Other Freshwater Organisms. *Toxicol. Assess.* 4, 451-462.
- 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.
- Edokpayi, J., N., Odiyo, J. O., Popoola, O. E., Msagati, T. A. M., 2016. Assessment of Trace Metals Contamination of Surface Water and Sediment: A Case Study of Mvudi River, South Africa. *Sustainability* 8, 135.
- Fargašová, A., Bumbálová, A., Havránek, E., 1999. Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , V^{5+}) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere* 38 (5), 1165-1173.
- Freitas, E. C., Rocha, O. 2011. Acute and chronic toxicity of chromium and cadmium to the tropical cladoceran *Pseudosidaramosa* and the implications for ecotoxicological studies. *Environ. Toxicol.* 29(2), 176-86.
- Gottardi, M., Birch, M. R., Dalhoff, K., Cedergreen, N., 2017. The effects of epoxiconazole and a-cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction and offspring size. *Environ. Toxicol. Chem.* 36(8), 2155-2166.

- Gushina, I.A., Harwood, J.L., 2006. Lead and copper effects on lipid metabolisms in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry* 67, 1731-1739.
- Harford, A. J., Mooney, T. J., Trenfield, M. A., Van Dam, R. A., 2015. Manganese toxicity to tropical freshwater species in low hardness water. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (12), 2856 – 2863.
- Hauck, M., Paul, A., Gross, S., Raubuch, M., 2003. Manganese toxicity in epiphytic lichens: chlorophyll degradation and interaction with iron and phosphorus. *Environ. Exp. Bot.* 49, 181-191.
- 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.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639.
- Ince, N. H., Dirilgen, N., Apikyan, G., Tezcanli, G., Üstün, B., 1999. Assessment of Toxic Interactions of Heavy Metals in Binary Mixtures: A Statistical Approach. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 365-372.
- Kaplan, D., Christiaen, D, Arad, S. M., 1987. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2953-2956.
- Keller, A. E., Zam, S. G., 1991. The acute toxicity of selected metals to the freshwater mussel, *Anodonta imbecilis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 539-546.
- Knauer, K., Jabusch, T., Sigg, L., 1999. Manganese uptake and Mn (II) oxidation by the alga *Scenedesmus subspicatus*. *Aquat. Sci.* 61, 44-58.
- Kováčik, J., Babula, P., Hedbavny, J., Kryštofová, O., Provazník, I., 2015. Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object. *Chemosphere* 120, 20-30.
- Lasier, P. J., Winger, P. V., Bogenrieder, K. J., 2000. Toxicity of Manganese to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 298-304.
- Lewis, M., 1978. Acute toxicity of copper, zinc and manganese in single and mixed salt solutions to juvenile longfin dace, *Agosia chrysogaster*. *J. Fish Biol.* 13, 695-700.

- Liu, D., Wong, P. T. S., Dutka, B. J., 1973. Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method. *Water Res.* 7, 741–746.
- Liu, J., Tan, K., He, L., Yongting, Q., Tan, W., Guo, Y., Wang, Z., Sun, W., 2018. Effect of limitation of iron and manganese on microalgae growth in fresh water. *Microbiology* 164, 1514-1521.
- Lombardi, A. T., Maldonado, M. T., 2011. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynth. Res.* 108, 77-87.
- Lombardi, A.T., Wangersky, P.J., 1991. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 77, 39-47.
- Mansano, A. S., Moreira, R. A., Dornfeld, H. C., Freitas, E. C., Vieira, E. V., Sarmiento, H., Rocha, O., Selegim, M. H.R., 2017. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 312-321.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 631-645.
- Martínez-Ruiz, E. B., Martínez-Jerónimo, F., 2015. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga *Ankistrodesmus falcatus*: An integrative study. *Aquat. Toxicol.* 169, 27-36.
- McLarnon-Riches, C. J., Rolph, C. E., Greenway, D. L. A., Robinson, P. K., 1998. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. *Phytochemistry* 49(5), 1241-1247.
- Nalewajko, C., O'Mahony, M. A., 1989. Photosynthesis of algal cultures and phytoplankton following an acid pH shock. *Journal of Phycology* 25, 319-325.
- OECD – Organization for Economic Co-operation and Development, 2002. OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria. Growth Inhibition Test, 21 pp.
- Parrish, C. C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer New York, New York, NY, pp. 4–20.

- Pereira, C. D., Tchy, J. G., Ganzarolli, E. M., Quináia, S. P., 2012. Chromium fractionation and speciation in natural waters. *J. Environ. Monit.*, 14, 1559.
- Rand, G., 1995. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis, Washington, DC.
- Rai, D., Eary, L. E., Zachara, J. M., 1989. Environmental Chemistry of Chromium. *Sci. Total Environ.* 86, 15-23.
- Reis, L. L., Alho, L. O. G., Abreu, C. B., Melão, M. G. G., 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., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., 2016. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). *Ecotoxicology* 25:1468-1477. <http://doi.org/10.1007/s10646-016-1698-7>
- Rodgher, S., Espíndola, E. L. G., Simões, F. C. F., Tonietto, A. E., 2012. Cadmium and Chromium Toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Microcystis aeruginosa*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55 (1), 161-169.
- Rodríguez, M. C., Barsani, L., Passareli, V., Evangelista, V., Conforti, V., Gualtieri, P., 2007. Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Res.* 105, 234-239.
- Sánchez-Fortún, S., López-Rodas, V., Navarro, M., Marvá, F., D'ors, A., Rouco, M., Haigh-Florez, D., Costas, E., 2009. Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (9), 1901-1905.
- 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. *Freshw. Biol.* 53, 756-771.
- Sharma, K. K., Schumann, H., Schenk, P. M., 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5, 1532–1553.
- Silva, J. C., Echeveste, P., Lombardi, A. T., 2018. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161, 57-63.
- Singh, S. P., Kashyap, A. K., 1978. Manganese toxicity and mutagenesis in two blue-green algae. *Environ. Exp. Bot.* 18, 47-53.

- Sunda, W. G., Huntsman, S. A., 1985. Regulation of cellular manganese and manganese transport rates in the unicellular alga *Chlamydomonas*. *Limnol. Oceanogr.* 30(1), 71-80.
- Stubblefield, W. A., Brinkman, S. F., Davies, P. H., Garrison, T. D., Hockett, J. R., McIntyre, M. W., 1997. Effects of water hardness on the toxicity of manganese to developing brown trout (*Salmo trutta*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16(10), 2082-2089.
- Švec, P., Kováčik, J., Hedbavný, J., Babula, P., Rotková, G., Klejdus, B., 2016. Impact of anions, cations, and pH on manganese accumulation and toxicity in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Water Air Soil Pollut.* 227, 161.
- Systat, 2008. Systat Software, Incorporation SigmaPlot for Windows version 11.0.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2012. Ecological Effects Test Guidelines, Algal Toxicity. Washington D.C., USA, 26 pp.
- Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Ali, M. B., Singh, S. N., 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* 41, 1075-1082.
- Velma, V., Vutukuru, S. S., Tchounwou, P. B., 2009. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: A critical review. *Rev. Environ. Health* 24(2), 129-145.
- Volland, S., Lütz, C., Michalke, B., Lütz-Meindl, U., 2012. Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquat. Toxicol.* 109, 59-69.
- Zhong, W., Zhang, Y., Wu, Z., Yang, R., Chen, X., Yang, J., Zhu, L., 2018. Health risk assessment of heavy metals in freshwater fish in the central and eastern North China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 157, 343-349.

MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 3

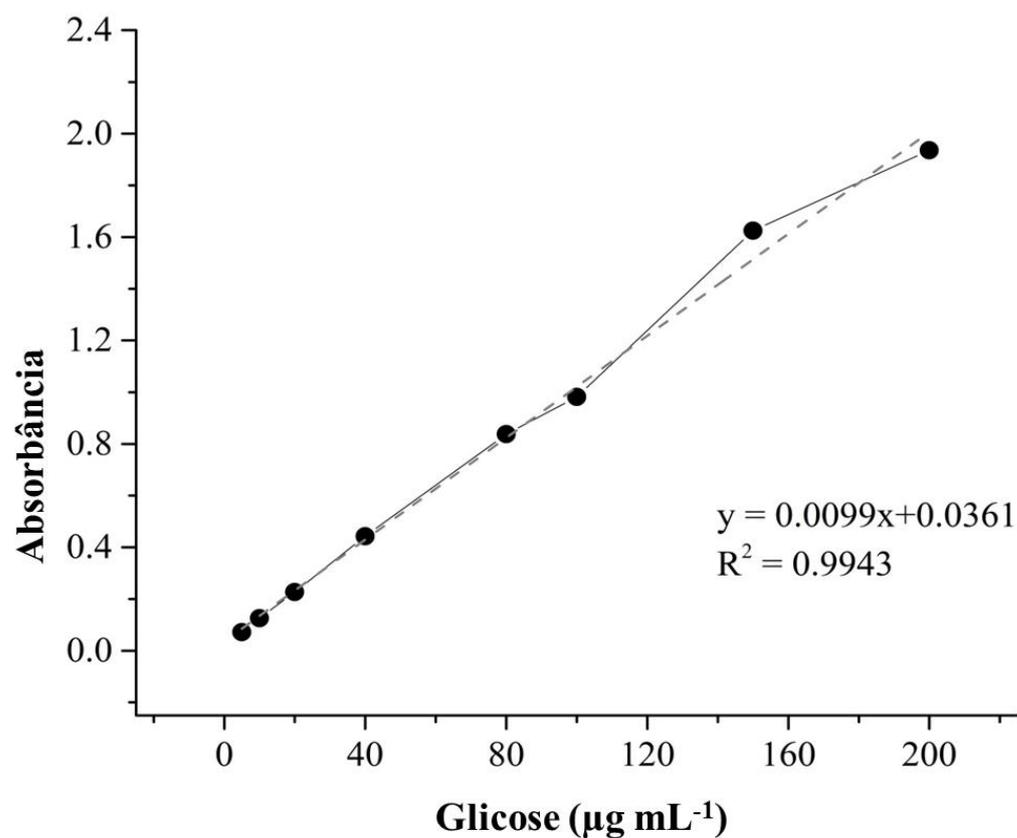


Fig. S1: Curva de calibração de carboidratos com 8 concentrações de dextrose anidra (5, 10, 20, 40, 80, 100, 150 e 200 µg mL⁻¹) utilizada como padrão *versus* valores de absorvância.

Tabela S1: Medidas da fluorescência da clorofila *a* (FL3-H relativa) e da taxa relativa de crescimento (TRC) de *Raphidocelis subcapitata* após 96 hrs de exposição ao Mn e ao Cr nas formas isolada e combinada.

Mn (μM)	Cr (μM)	FL3-H (a.u.)	Taxa Relativa de Crescimento
0,009 (Controle)	0,00	$0,61 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,00$
1,45	0,00	$0,45 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,01$
3,64	0,00	$0,36 \pm 0,00$	$0,64 \pm 0,02$
7,28	0,00	$0,31 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,00$
14,56	0,00	$0,30 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,03$
0,00	3,84	$0,67 \pm 0,04$	$2,70 \pm 0,20$
0,00	7,68	$0,51 \pm 0,01$	$1,30 \pm 0,13$
0,00	15,36	$0,40 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,10$
0,00	19,20	$0,34 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,10$
1,45	3,84	$0,53 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,04$
1,45	7,68	$0,40 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,02$
1,45	15,36	$0,55 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,16$
1,45	19,20	$0,51 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$
3,64	3,84	$0,41 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,01$
3,64	7,68	$0,42 \pm 0,00$	$0,86 \pm 0,02$
3,64	15,36	$0,43 \pm 0,00$	$0,47 \pm 0,01$
3,64	19,20	$0,47 \pm 0,00$	$0,41 \pm 0,03$
7,28	3,84	$0,45 \pm 0,07$	$0,79 \pm 0,09$
7,28	7,68	$0,42 \pm 0,00$	$0,60 \pm 0,02$
7,28	15,36	$0,51 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,04$
7,28	19,20	$0,63 \pm 0,12$	$0,17 \pm 0,14$
14,56	3,84	$0,40 \pm 0,00$	$0,68 \pm 0,01$
14,56	7,68	$0,41 \pm 0,00$	$0,60 \pm 0,01$
14,56	15,36	$0,62 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,04$
14,56	19,20	$0,53 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,10$

Tabela S2: Medidas de tamanho celular (FSC-H relativo) e espécies reativas de oxigênio (ROS) de *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição ao Mn e ao Cr nas formas isolada e combinada.

Mn (μM)	Cr (μM)	FSC-H (a.u.)	ROS relativo (%)
0,009 (Controle)	0,00	$0,73 \pm 0,01$	$100,00 \pm 19,45$
1,45	0,00	$0,72 \pm 0,02$	$148,13 \pm 18,04$
3,64	0,00	$0,70 \pm 0,00$	$177,40 \pm 8,52$
7,28	0,00	$0,74 \pm 0,01$	$139,71 \pm 2,41$
14,56	0,00	$0,73 \pm 0,00$	$128,05 \pm 20,71$
0,00	3,84	$0,76 \pm 0,00$	$178,70 \pm 1,80$
0,00	7,68	$0,73 \pm 0,01$	$121,00 \pm 30,76$
0,00	15,36	$0,64 \pm 0,04$	$141,51 \pm 14,38$
0,00	19,20	$0,61 \pm 0,01$	$166,12 \pm 1,74$
1,45	3,84	$0,67 \pm 0,04$	$87,04 \pm 43,96$
1,45	7,68	$0,61 \pm 0,00$	$133,65 \pm 14,11$
1,45	15,36	$0,55 \pm 0,05$	$127,57 \pm 76,14$
1,45	19,20	$0,70 \pm 0,02$	$258,63 \pm 5,24$
3,64	3,84	$0,61 \pm 0,00$	$118,37 \pm 55,88$
3,64	7,68	$0,61 \pm 0,00$	$106,04 \pm 25,96$
3,64	15,36	$0,67 \pm 0,00$	$209,10 \pm 20,54$
3,64	19,20	$0,60 \pm 0,00$	$164,11 \pm 66,42$
7,28	3,84	$0,64 \pm 0,05$	$70,57 \pm 19,22$
7,28	7,68	$0,64 \pm 0,00$	$49,11 \pm 10,20$
7,28	15,36	$0,67 \pm 0,04$	$193,29 \pm 58,80$
7,28	19,20	$0,73 \pm 0,01$	$291,71 \pm 0,75$
14,56	3,84	$0,60 \pm 0,00$	$221,53 \pm 111,01$
14,56	7,68	$0,61 \pm 0,00$	$103,88 \pm 8,98$
14,56	15,36	$0,73 \pm 0,03$	$250,68 \pm 80,50$
14,56	19,20	$0,73 \pm 0,04$	$234,09 \pm 121,94$

Tabela S3: Carboidratos totais e lipídios totais de *Raphidocelis subcapitata* expostos ao Mn e ao Cr nas formas isolada e combinada. ND significa não detectado.

Mn (μM)	Cr (μM)	Carboidratos (pg cel^{-1})	Lipídios (pg cel^{-1})
0,009 (Controle)	0,00	$8,79 \pm 0,13$	$3,35 \pm 0,30$
1,45	0,00	$7,99 \pm 1,18$	$2,00 \pm 0,35$
3,64	0,00	$5,42 \pm 0,54$	$1,35 \pm 0,04$
7,28	0,00	$4,57 \pm 0,28$	$7,83 \pm 0,03$
14,56	0,00	$4,45 \pm 0,60$	$6,82 \pm 0,93$
0,00	3,84	$4,06 \pm 0,47$	$2,48 \pm 0,28$
0,00	7,68	$5,86 \pm 1,13$	$2,93 \pm 0,30$
0,00	15,36	$2,46 \pm 0,23$	$2,95 \pm 0,11$
0,00	19,20	$5,45 \pm 0,08$	$2,67 \pm 0,07$
1,45	3,84	$3,50 \pm 1,47$	$1,43 \pm 0,26$
1,45	7,68	$5,51 \pm 0,35$	$1,80 \pm 0,16$
1,45	15,36	$6,08 \pm 1,85$	$3,15 \pm 0,44$
1,45	19,20	$10,32 \pm 1,12$	$4,15 \pm 0,34$
3,64	3,84	$5,61 \pm 1,13$	$2,49 \pm 0,34$
3,64	7,68	$4,67 \pm 0,57$	$2,76 \pm 0,30$
3,64	15,36	$6,67 \pm 0,11$	$3,29 \pm 0,26$
3,64	19,20	$5,92 \pm 1,94$	$3,32 \pm 0,24$
7,28	3,84	$9,90 \pm 1,75$	$1,45 \pm 0,15$
7,28	7,68	ND	$1,50 \pm 0,05$
7,28	15,36	ND	$2,89 \pm 0,15$
7,28	19,20	$19,09 \pm 1,92$	$3,51 \pm 0,29$
14,56	3,84	$6,32 \pm 1,89$	$2,77 \pm 0,27$
14,56	7,68	$5,64 \pm 0,80$	$2,55 \pm 0,07$
14,56	15,36	$6,70 \pm 0,52$	$2,55 \pm 0,07$
14,56	19,20	$6,65 \pm 0,71$	$1,83 \pm 0,01$

Tabela S4: Composição das classes lipídicas (pg cel⁻¹) de *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Mn e ao Cr nas suas forma isoladas. As classes lipídicas são HC (hidrocarbonetos alifáticos), KET (cetona), TAG (triglicerídeos), FFA (ácidos graxos livres), ST (esterol livre), AMPL (lipídios polares móveis de acetona) e PL (fosfolipídios). ND significa Não Detectado.

Mn (µM)	Cr (µM)	Classes lipídicas (pg cel ⁻¹)						
		HC	KET	TAG	FFA	ST	AMPL	PL
0,009 (Controle)	0,00	0,16 ± 0,03	0,49 ± 0,14	0,87 ± 0,08	0,11 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,91 ± 0,02	0,21 ± 0,01
1,45	0,00	0,11 ± 0,02	0,04 ± 0,04	0,45 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,65 ± 0,03	0,47 ± 0,12
3,64	0,00	0,09 ± 0,01	0,02 ± 0,00	ND	0,08 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,63 ± 0,07	0,15 ± 0,01
7,28	0,00	0,42 ± 0,05	2,04 ± 0,09	0,99 ± 0,08	0,46 ± 0,06	0,68 ± 0,06	1,03 ± 0,08	1,22 ± 0,16
14,56	0,00	0,53 ± 0,07	0,93 ± 0,12	0,70 ± 0,14	0,61 ± 0,06	0,81 ± 0,00	1,30 ± 0,10	1,57 ± 0,02
0,00	3,84	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,72 ± 0,10	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,70 ± 0,10	0,75 ± 0,05
0,00	7,68	0,13 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,00 ± 0,13	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,52 ± 0,07	0,72 ± 0,06
0,00	15,36	0,09 ± 0,02	0,28 ± 0,06	0,39 ± 0,01	0,19 ± 0,10	0,24 ± 0,00	0,37 ± 0,06	1,47 ± 0,12
0,00	19,20	0,12 ± 0,02	0,23 ± 0,04	0,52 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,62 ± 0,03	1,08 ± 0,09

5. CONCLUSÕES

- Tanto o Mn quanto o Cr, quando avaliados isoladamente, levaram à inibição do crescimento da microalga, entre 0 e 72 horas de exposição. Após 96 horas de exposição aos metais isolados, a alga recuperou seu crescimento em relação ao tratamento com o Cr, que não causou redução significativa na taxa relativa de crescimento quando comparada ao controle. Em concentrações baixas (3,84 e 7,68 μM), o Cr estimulou o crescimento da microalga, o que caracteriza um efeito de hormesis;

- Levando em conta os efeitos no crescimento e na fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*), o Mn foi o metal mais tóxico para a microalga, quando comparado ao Cr. Uma das razões para essa maior toxicidade do Mn pode ser o fato de que a maior parte do Mn adicionado se dissociou como íon livre (Mn^{2+}), de acordo com as estimativas do modelo de especiação MINEQL⁺ (versão 4.62.3), enquanto a maior parte do Cr adicionado estava complexada formando hidróxidos;

- Em comparação com outros organismos aquáticos, a microalga *R. subcapitata* foi a espécie mais sensível ao Mn, de acordo com a curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies, e se encontra entre as mais sensíveis ao Cr;

- Quando expostos isoladamente, Mn e Cr reduziram significativamente a fluorescência da Chl *a* da alga. Isso possivelmente se deu devido ao deslocamento do Mn no centro da molécula de clorofila, no caso do Mn, e ao possível deslocamento do Mg no centro ativo da enzima ALAD, no caso do Cr;

- O Mn levou à alterações mais severas do que o Cr na atividade fotossintética da clorofíceia. Nas concentrações mais altas, o Mn afetou a eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_V), reduziu o rendimento quântico efetivo da alga (Φ'_M), bem como o *quenching* fotoquímico (qP). A exposição ao Cr nas concentrações mais altas induziu a ativação de processos não-fotoquímicos, conforme revelado pelo aumento nos valores dos *quenchings* não fotoquímicos qN e NPQ, além de aumentar o rendimento máximo (Φ_M) da alga;

- A ativação de processos não fotoquímicos na alga, em resposta à exposição ao Cr, foi eficiente em reduzir os possíveis danos causados por esse metal ao aparato fotossintético da microalga, o que contribui para a explicação da menor toxicidade do Cr em comparação com o Mn;

- Após 96 horas de exposição aos metais, os níveis de ROS intracelular aumentaram. O aumento do teor de lipídios totais nas algas expostas ao Mn provavelmente atuou como mecanismo de defesa, reduzindo o aumento dos níveis de ROS na célula;

- Tanto o Mn quanto o Cr induziram redução no teor de carboidratos totais, mas o Mn levou à um aumento na concentração de lipídios totais, enquanto o Cr reduziu esse parâmetro bioquímico. Em relação à composição de classes lipídicas, a resposta da alga foi diferente para cada metal. Os dois metais induziram um aumento nos níveis de PL, provavelmente como mecanismo de proteção da membrana. Mas o Mn mostrou uma tendência em aumentar o teor de classes lipídicas, como de HC, KET, FFA, ST e AMPL, enquanto o Cr causou redução da concentração de várias classes, como de TAG, ST e AMPL;

- A mistura de Mn e Cr, quando analisada à nível populacional (crescimento algal), mostrou efeitos aditivos (sem interação entre os metais), e o modelo de Ação Independente (AI; que considera que os compostos tem modo de ação diferente) foi o que melhor se ajustou aos dados;

- Apesar dos efeitos negativos dos dois metais sobre a fluorescência da Chl *a*, quando expostos isoladamente, quando combinados o Mn e o Cr não levaram à alterações significativas desse parâmetro, o que indica um efeito antagônico;

- Todas as concentrações de Mn combinadas com a concentração mais alta de Cr foram sinérgicas para F_0/F_V . Além disso, a mistura de Mn e Cr apresentou efeitos sinérgicos para o Φ_M e antagônicos para o teor de carboidratos totais da microalga;

- Com base nos nossos resultados, nós enfatizamos a importância de se considerar a interação de metais em estudos ecotoxicológicos, no intuito de que os efeitos desses compostos para a biota aquática não sejam subestimados.

6. REFERÊNCIAS

- Alho, L. O. G., Gebara, R. C., Paina, K. A., Sarmento, H., Melão, M. G. G., 2019. Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 950-959.
- Bao, V. W., Leung, K. M., Qiu, J. W., Lam, M. H., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1147 – 1151.
- Bashir, K., M., I., Lee, H-J., Mansoor, S., Jahn, A., Cho, M-G., 2021. The Effect of Chromium on Photosynthesis and Lipid Accumulation in Two Chlorophyte Microalgae. *Energies* 14, 2260.
- Belay, A. A., 2010. Impacts of Chromium from Tannery Effluent and Evaluation of Alternative Treatment Options. *J. Environ. Prot. Sci.* 1, 53-58.
- Bliss, C. I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-615.
- Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., Vona, V., 2013. Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *SpringerPlus* 2:147.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (3), 335-347.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., Parrish, C. C., 2013. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. *Aquatic Toxicology*, 128-129, 171-182.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., Parrish, C. C., 2015. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (trebouxiophyceae). *Aquatic Toxicology*, 160, 87-95.
- CONAMA MMA, 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera, Resolução No 430/13-05-2011, Conselho Nacional do Meio Ambiente do Ministério do Meio Ambiente. CONAMA-MMA, Brazil.
- Cosgrove J., Borowitzka M. A., 2010. Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In Suggett D. J., Prášil O., Borowitzka M. A. (eds), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications, Developments in Applied Phycology*. Vol. IV. Springer, New York, 1–17.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barret, S. M., Garland, C. D., 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *J. Appl. Phycol.* 5, 71-83.
- Derks, A., Schaven, K., Bruce, S., 2015. Diverse mechanisms for photoprotection in photosynthesis. Dynamic regulation of photosystem II excitation in response to rapid environmental change. *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 468-485.
- DNPM, 2015. Sumário Mineral. Departamento Nacional de Produção Mineral, Brasília, v.35, 131 p.

DNPM, 2016. Anuário Mineral Brasileiro: principais substâncias metálicas. Departamento Nacional de Produção Mineral, Brasília, 31 p.

Echols, B.S., Currie, R.J., Cherry, D.S., 2010. Preliminary results of laboratory toxicity tests with the mayfly, *Isonychia bicolor* (Ephemeroptera: Isonychiidae) for development as a standard test organism for evaluating streams in the Appalachian coalfields of Virginia and West Virginia. 169, p. 487-500.

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

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, v. 21, n.11, p. 2412-2422.

Giardi MT, Koblizek M, Masojidek J (2001) Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. Biosens Bioelectron 16:1027–1033.

Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N. R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General. Subj. 990, 87–92.

Hanazato, T.; Dodson, S. I., 1995. Synergistic effects of low oxygen concentration, predator kairomone and a pesticide on the cladoceran *Daphnia pulex*. Limnology and Oceanography, 40, p.700-709.

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.

Hook, S. E., Fisher, N. S., 2001. Sublethal effects of silver in zooplankton: Importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 20(3), 568-574.

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. Environ. Toxicol. Chem. 24, 2701-2713.

Juneau, P., El Berdey, A., Popovic, R., 2002. PAM Fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42, 155–164.

Keller, A. E., Zam, S. G., 1991. The acute toxicity of selected metals to the freshwater mussel, *Anodonta imbecilis*. Environ. Toxicol. Chem. 10, 539-546.

Kriedemann, P. E., Graham, R. D., Wiskich, J. T., 1985. Photosynthetic dysfunction and *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence from manganese-deficient wheat leaves. Aust. J. Agric. Res. 36, 157-169.

- Lasier, P. J., Winger, P. V., Bogenrieder, K. J., 2000. Toxicity of Manganese to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38, 298-304.
- Lim, C. Y., Yoo, Y. H., Sidharthan, M., Ma, C. W., Bang, I. C., Kim, J. M., Lee, K. S., Park, N. S.,
- Shin, H. W., 2006. Effects of copper (I) oxide on growth and biochemical compositions of twomarine microalgae. Journal of Environmental Biology, 27 (3), 461-466.
- Liu, D; Wong, P.T.S; Dutka, B.J., 1973. Determination of carbohydrate in lake sediment by amodified phenol-sulfuric method. Water Research, 7, 741-746.
- Liu, Y., Vijver, M. G., Pan, B., Peijnenburg, W. J. G. M., 2017. Toxicity models of metal mixtures established on the basis of “additibity” and “interactions”. Front. Environ. Sci. Eng. 11 (2), 10.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Combinated effects I announcement-implements to the problem. Naunyn-Schmiedebergs. Achr. Exp. Pathol. Pharmakol. 114, 313-326.
- Loureiro, S., Svendsen, C., Ferreira, A. L. G., Pinheiro, C., 2010. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. Environ. Toxicol. Chem. 29 (8), 1716-1726.
- Madoni, P., Davoli, D., Gorbi, G., Vescovi, L., 1996. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. Wat. Res. 30 (1), 135-141.
- Mallick, N., Mohn, F. H., 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 64–69.
- Mansano, A. S., Moreira, R. A., Dornfeld, H. C., Freitas, E. C., Vieira, E. V., Sarmiento, H., Rocha, O., Selegim, M. H.R., 2017. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 142, 312-321.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. Appl. Microbiol. Biotechnol. 96, 631-645.
- Martínez-Jerónimo, F., 2006. Effect of culture conditions and mother’s age on the sensitivy of *Daphnia magna* Straus 1820 (Cladocera) neonates to hexavalent chromium. Ecotoxicology 15, 259-266.
- Martínez-Ruiz, E. B., Martínez-Jerónimo, F., 2015. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the grenn microalga *Ankistrodemus falcatus*: An integrative study. Aquat. Toxicol. 169, 27-36.
- Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., Poggiale, J-C., 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. Aquat. Toxicol. 99, 309-319.
- Maxwell, K., Johnson, G. N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. Jour. Environ. Bot. 51 (345), 659-668.

- Melegari, S. P., Perreault, F., Costa, R. H. R., Popovic, R., Matias, W. G., 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 142-143, 431-440.
- Melis A., 1999. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage? *Trends Plant Sci.* 1999 Apr. 4(4):130-135.
- Miao, A. J., Wang, W. X., Juneau, P., 2005. Comparison of Cd, Cu and Zn toxicity effects on four marine phytoplankton by Pulse-Amplitude-Modulated Fluorometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2603-2611.
- Moreira, R. A., Rocha, G. S., Silva, L. C. M., Goulart, B. V., Montagner, C. C., Melão, M. G., 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.
- Nalewajko, C., O'Mahony, M. A., 1989. Photosynthesis of algal cultures and phytoplankton following an acid pH shock. *Journal of Phycology* 25, 319-325.
- Nys, C., Van Regenmortel, T., Janssen, C. R., Oorts, K., Smolders, E., De Schampelaere, K. A. C., 2018. A framework for ecological risk assessment of metal mixtures in aquatic systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 37 (3), 623-642.
- Parrish, C. C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer New York, New York, NY, pp. 4–20.
- Pavlaki, M. D., Pereira, R., Loureiro, S., Soares, A. M. V. M., 2011. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 99-110.
- Perales-Vela, H. V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C., Cañizares-Villanueva, R. O., 2007. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere* 67, 2274-2281.
- Peters, A., Lofts, S., Merrington, G., Brown, B., Stubblefield, W., Harlow, K., 2011. Development of biotic ligand models for chronic manganese toxicity to fish, invertebrates, and algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (1), 2407-2415.
- Reis, L. L., Alho, L. O. G., Abreu, C. B., Melão, M. G. G., 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., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., 2016. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). *Ecotoxicology* 25, <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1698-7>
- Rodgher, S., Espíndola, E. L. G., Simões, F. C. F., Tonietto, A. E., 2012. Cadmium and Chromium Toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Microcystis aeruginosa*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55 (1), 161-169.
- Rodríguez, M. C., Barsani, L., Passareli, V., Evangelista, V., Conforti, V., Gualtieri, P., 2007. Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Res.* 105, 234-239.

- Rojícková-Padrťová, R., Maršálek, B., 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere* 38 (14), 3329-3338.
- Ronco, A., Báez, M. C. D., Granados, Y. P., 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas – Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. In: Morales, G. C. (ed). Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa.
- Sánchez-Fortún, S., López-Rodas, V., Navarro, M., Marvá, F., D'ors, A., Rouco, M., Haigh-Florez, D., Costas, E., 2009. Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (9), 1901-1905.
- Sanyal, T., Kaviraj, A., Saha, S., 2017. Toxicity and bioaccumulation of chromium in some freshwater fish. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 23 (7), 1655-1667.
- 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. *Freshw. Biol.* 53, 756-771.
- Schreiber, U., 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynthesis research* 9, 261-272.
- Schreiber, U., Bilger, W., 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect, In: Behnke, H.D., Lüttge, U., Esser, K., Kadereit, J. W., Runge, M., (Eds.), *Progress in Botany. Fortschritte der Botanik* 54, pp. 151-173.
- Sharma, K. K., Schumann, H., Schenk, P. M., 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5, 1532-1553.
- Shaw, J. R., Dempsey, T. D., Chen, C. Y., Hamilton, J. W., Folt, C. L., 2006. Comparative toxicity of cadmium, zinc, and mixtures of cadmium and zinc to daphnids. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(1), 182-189.
- Singh, S. P., Kashyap, A. K., 1978. Manganese toxicity and mutagenesis in two blue-green algae. *Environmental and Experimental Botany*, v.18, p. 47-53.
- Sunda, W. G., Huntsman, S. A., 1985 – Regulation of cellular manganese and manganese transport rates in the unicellular alga *Chlamydomonas*. *Limnol. Oceanogr.*, v.30, n.1, p. 71-80
- Suzuki, S., Yamaguchi, H., Nakajima, N., Kawachi, M., 2018. *Raphidocelis subcapitata* (= *Pseudokirchneriella subcapitata*) provides an insight into genome evolution and environmental adaptations in the Sphaeropleales. *Scientific Reports* 8: 8058.
- Systat, 2008. Systat Software, Incorporation SigmaPlot for Windows version 11.0.
- USEPA, 2009. National Recommended Water Quality Criteria (4304T). Office of Water, Office of Science and Technology. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- US EPA, 2012. 2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. Agency, Office of Water, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Vaiopoulou, El., Gikas, P., 2020. Regulations for chromium emissions to the aquatic environment in Europe and elsewhere. *Chemosphere*, 126876.

Vidotti, E.C., Rollemberg, M.C., 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Quim. Nova*, 27 (1), 139-145.

Wilhelm, C.; Jakob, T., 2011. From photons to biomass and biofuels: evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92(5), 909-919