

Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Instituto de Oceanografia
Programa de Pós-Graduação em Oceanologia

INFLUÊNCIA DA PLASTISFERA NA TOXICIDADE DE MICROPLÁSTICOS ASSOCIADOS AO COBRE

LUANA PEÇANHA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Oceanologia, como parte
dos requisitos para a
obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: *Profa. Dra.* GRASIELA LOPES LEÃES PINHO
Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil.

Coorientadora: *Profa. Dra.* SANYE SOROLDONI GUIMARÃES GOES
Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil.

Rio Grande, RS, Brasil
Julho 2026

INFLUÊNCIA DA PLASTISFERA NA TOXICIDADE DE MICROPLÁSTICOS ASSOCIADOS AO COBRE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Oceanologia, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de
Mestre

por

LUANA PEÇANHA DOS SANTOS

Rio Grande, RS, Brasil

Julho 2026

© A cópia parcial e a citação de trechos desta tese são permitidas sobre a condição de que qualquer pessoa que a consulte reconheça os direitos autorais do autor. Nenhuma informação derivada direta ou indiretamente desta obra deve ser publicada sem o consentimento prévio e por escrito do autor.

S237i

Santos, Luana Peçanha dos

Influência da plastisfera na toxicidade de microplásticos associados ao cobre / Luana Peçanha dos Santos. – 2026.

109 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – Programa de Pós-Graduação em Oceanologia, 2026.

Orientadora: Dra. Grasiela Lopes Leães Pinho

Coorientadora: Dra. Sanye Soroldoni Guimarães Goes

1. Biodisponibilidade. 2. Ecotoxicologia. 3. Fotodegradação
4. Nitocra I. Pinho, Grasiela Lopes Leães. II. Goes, Sanye Soroldoni
Guimarães III. Título.

CDU 551.46



ATA ESPECIAL DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO – 06/2026

Às quatorze horas do dia vinte e sete de julho do ano dois mil e vinte e seis, de forma Virtual: <https://conferenciaweb.mnp.br/sala/grasiela-lobes-leaes-pinho-grasiela>, Presencial: Auditório João Rocha – FURG/C. Carreiros, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de **MESTRADO** intitulada: **“INFLUÊNCIA DA PLASTISFERA NA TOXIDADE DE MICROPLÁSTICOS ASSOCIADOS AO COBRE”**, da Acad. **Luana Peçanha dos Santos**. A Comissão Examinadora foi composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. Grasiela Lopes Leães Pinho – Orientadora – (PPGO-IO/FURG); Dra. Sany Soroldoni Guimarães Góes – Coorientadora – (FURG); Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi – (UFPR); Profa. Dra. Ligia Dias de Araújo – (FURG) e Profa. Dra. Marta Marques de Souza – (FURG). Dando início à reunião, a Profa. Dra. Grasiela Lopes Leães Pinho, Coordenadora do PPGO, agradeceu a presença de todos e fez a apresentação da Comissão Examinadora. Logo após esclareceu que a candidata teria um tempo de 45 a 60 min para explanação do tema, e cada membro da Comissão Examinadora, um tempo máximo de 30 min para perguntas. A seguir, passou à palavra a candidata que apresentou o tema e respondeu às perguntas formuladas. Após ampla explanação, a Comissão Examinadora reuniu-se em reservado para discussão do conceito a ser atribuído a candidata. Foi estabelecido que as sugestões de todos os membros da Comissão Examinadora, que seguem em pareceres em anexo, foram aceitas pelo Orientadora/Candidata para incorporação na versão final da Dissertação. Finalmente, a Comissão Examinadora considerou a candidata APROVADA, por unanimidade. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ATA, por mim, Clabisnei Moura de Melo – Secretário PPGO, que após lida e aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora, pela Candidata e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Oceanologia.



Documento assinado digitalmente
GRASIELA LOPES LEAES PINHO
Data: 28/07/2026 11:30:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Grasiela Lopes Leães Pinho



Documento assinado digitalmente
SANYE SOROLDONI GUIMARAES GOES
Data: 28/07/2026 11:01:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Sany Soroldoni Guimarães Góes



Documento assinado digitalmente
MARCO TADEU GRASSI
Data: 28/07/2026 10:17:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi



Documento assinado digitalmente
LIGIA DIAS DE ARAUJO
Data: 28/07/2026 10:43:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ligia Dias Araújo



Documento assinado digitalmente
MARTA MARQUES DE SOUZA
Data: 28/07/2026 10:24:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Marta Marques de Souza



Documento assinado digitalmente
LUANA PECANHA DOS SANTOS
Data: 28/07/2026 10:53:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Acad. Luana Peçanha dos Santos



Documento assinado digitalmente
GRASIELA LOPES LEAES PINHO
Data: 28/07/2026 11:31:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra Grasiela Lopes Leães Pinho
Coordenadora PPGO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por toda a dedicação e apoio. O zelo e o desvelo de vocês foram o alicerce que viabilizou minha trajetória até aqui.

Às minhas orientadoras, Grasiela e Sanye, por guiarem meus passos com maestria, e ao Mikael e à Vanessa, cujas contribuições foram igualmente vitais. O conhecimento compartilhado por vocês transcende a técnica e me proporcionou um autêntico amadurecimento científico, sendo o alicerce determinante para o desenvolvimento e a solidez desta pesquisa.

Aos amigos de longa data e àqueles que o caminho me apresentou recentemente, agradeço pela partilha e pelo companheirismo em diferentes momentos desta jornada.

Aos laboratórios parceiros que contribuíram para este estudo, agradeço ao Laboratório de Físico-química Aplicada e Tecnológica (LAFQAT), pela proveniência dos polímeros utilizados. Ao Laboratório de Ecologia de Microorganismos Aplicada à Aquacultura (LEMAQUI) e ao Grupo de Pesquisa em Biomonitoramento e Ecotoxicologia Aquática (ECOBIOTOX) pelo suporte técnico e infraestrutura cedidas para as análises. Um agradecimento especial aos professores Maximiliano Maronna e Camila Martins pela valiosa parceria.

Aos amigos e colegas do CONECO, pela parceria diária e por fazerem do laboratório um ambiente de constante aprendizado.

A todos aqueles que, com sua presença ou auxílio, foram parte essencial para que este momento se tornasse realidade.

Ao mar pela consciência, presença e sabedoria.

Índice

Agradecimentos	v
Índice	vi
Lista de Figuras da Dissertação	viii
Lista de Figuras do Manuscrito	ix
Lista de Tabelas do Manuscrito	xi
Lista de Acrônimos e Abreviações	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
Prefácio	17
Capítulo I: Introdução	19
1.1 Processos de Colonização Microbiana e a Formação da Plastisfera.....	23
1.2 A Interface Química dos Microplásticos e a Ecotoxicologia do Cobre.....	27
1.3 Particularidades do Policarbonato e Avaliação com Organismos-teste.....	32
Capítulo II: Objetivos	37
Capítulo III: Material e Métodos	38
3.1 Microplásticos e Processo de Fotodegradação Artificial.....	38
3.1.1 Análise estrutural dos microplásticos a partir da Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40
3.1.2 Caracterização química dos microplásticos via espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	41

3.2 Formação Experimental da Plastisfera.....	42
3.3 Caracterização da Plastisfera.....	43
3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	43
3.3.2 Densidade Bacteriana por Microscopia de Epifluorescência.....	44
3.3.3 Pigmentos Fotossintéticos.....	45
3.3.4 Caracterização Molecular da Comunidade.....	46
3.4 Organismo-Teste.....	46
3.4.1 Cultivo e Manutenção de <i>Nitocra</i> sp.....	46
3.4.2 Identificação Genética.....	48
3.4.3 Carta Controle e Monitoramento da Sensibilidade.....	49
3.5 Delineamento Experimental dos Ensaios Ecotoxicológicos.....	49
3.5.1 Estrutura Geral dos Tratamentos.....	49
3.5.2 Exposição a Microplásticos Prístinos e Fotodegradados.....	50
3.5.3 Exposição ao Cobre Isolado.....	50
3.5.4 Exposição Combinada.....	51
3.5.5 Efeito da Plastisfera Isolada e Associada ao Cobre.....	51
3.6 Monitoramento Químico e Determinação Analítica do Cobre.....	52
3.7 Análises Estatísticas.....	52
Capítulo IV: Artigo Científico	54
Capítulo V: Síntese da Discussão	94
Capítulo VI: Conclusões.....	96
Capítulo VII: Perspectivas Futuras.....	98
Capítulo VIII: Referências Bibliográficas da Dissertação.....	100

Lista de Figuras de Dissertação

Figura 1. Representação esquemática da classificação de microplásticos conforme sua origem, distinguindo partículas primárias e secundárias.....	21
Figura 2. Resumo esquemático dos processos gerais envolvidos na degradação de microplásticos, diferenciando as vias abióticas e bióticas.....	22
Figura 3. Representação esquemática das fases de colonização e sucessão microbiana na superfície de microplásticos.....	24
Figura 4. Processo de formação de biofilme na superfície de micropartículas...	25
Figura 5. Esquema dos processos de intemperismo, formação de biofilme, adsorção de contaminantes e potencial de toxicidade associado a microplásticos.....	30
Figura 6. Esquema conceitual das vias de interação química e dos fatores ambientais e estruturais que influenciam o papel dos microplásticos como vetores de metais-traço em ambientes aquáticos.....	32
Figura 7. Montagem experimental para a exposição de microplásticos a radiação ultravioleta, utilizando lâmpada de vapor de mercúrio de 400 W sem invólucro externo.....	39
Figura 8. Comparação visual entre microplásticos prístinos e fotodegradados após o período de exposição artificial.....	40
Figura 9. Localização do ponto de coleta na Praia do Cassino, Rio Grande, RS, local de obtenção do inóculo inicial utilizado nos ensaios experimentais.....	43
Figura 10. Representação esquemática do ciclo de vida do copépode harpacticoide <i>Nitocra</i> sp. obtida por meio de capturas em microscópio óptico....	48

Lista de Figuras do Manuscrito

Figure 1: Micrographs obtained by Scanning Electron Microscopy illustrating the temporal evolution of plastsphere formation on microplastics.....	65
Figure 2: Biological characterisation of the plastsphere on microplastics used in toxicity assays: (A) bacterial density and (B) chlorophyll-a concentration.....	66
Figure 3: Relative abundance of plastsphere communities. Taxonomic composition at the genus level demonstrating variation in the percentage abundance of the most abundant genera: (A) Bacteria, (B) Eukaryotes and (C) Fungi.....	68
Figure 4: Community succession and dynamics. Heatmaps illustrating the variation in percentage abundance of the 20 most abundant genera for (A) Bacteria, (B) Eukaryotes and (C) Fungi throughout the experimente.....	70
Figure 5: Mortality of <i>Nitocra</i> sp. (%) after 96 h of exposure. (A) Isolated Cu effect. (B) Effect of pristine and photodegraded microplastics (MPs) at different densities. (C) Combined effect: nominal 0.25 and 0.5 mg L ⁻¹ Cu corresponded to measured 0.37 and 0.89 mg L ⁻¹	73
Figure 6: Data represent the mean ± standard deviation (n = 3) of <i>Nitocra</i> sp. mortality after 96 h of exposure to experimental treatments.....	74
Figure S1: Scanning Electron Microscopy (SEM) micrographs illustrating pristine (1A–1C) and photodegraded (2A–2C) MPs at different magnifications.....	87
Figure S2: Fourier transform infrared (FTIR) spectra of the polycarbonate (PC) used in the tests.....	88

Figure S3: Cladogram based on the COI gene for species of the Ameiridae family, including the sequence from this study..... 88

Figure S4: Medayn lethal concentration (LC_{50-96h} , $mg \cdot L^{-1}$) values obtained in monthly sensitivity tests with the reference substance Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) for *Nitocra* sp. Each point represents the estimated LC_{50-96h} for an independent test, conducted under controlled conditions of static exposure for 96 h..... 89

Figure S5. Sequence showing grazing activity by *Nitocra* on the plathisphere.89

Lista de Tabelas do Manuscrito

Table 1. Experimental design of static acute toxicity assays with nominal concentrations of copper (Cu) and microplastics (MPs).....	62
Table S1. Wavenumbers selected for integrating peaks and their baseline.....	88
Table S2. Results of monthly sensitivity tests with the reference substance Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) for the copepod <i>Nitocra</i> sp. Values expressed as median lethal concentration (LC _{50-96h}) and their respective confidence intervals (CI 95%).....	89
Table S3. Monthly means $\pm$ standard deviation (n=1) of physicochemical parameters (pH, dissolved oxygen, temperature and salinity) in chronic tests with SDS initial and final values.....	90
Table S4. Physicochemical parameters of water during the microplastic plastisphere formation experiment over time. The values refer to hydrogen ion potential (pH), dissolved oxygen (DO), temperature (°C), and salinity recorded at different time intervals from 1 to 30 days and at the final stage.....	90
Table S5. Means $\pm$ standard deviation (n=1) of physicochemical parameters (pH, dissolved oxygen, temperature and salinity) in acute toxicity tests on microplastics (MPs) and copper (Cu) (MPs, Cu, MP+Cu and plastisphere) initial and final values.....	90
Table S6. Summary of the analysis of variance (ANOVA) for bacterial density in the plastisphere on polycarbonate (PC) microplastics over exposure time, where df represents degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis	91
Table S7. Summary of the analysis of variance (ANOVA) for the concentration of photosynthetic pigments in the plastisphere on polycarbonate (PC) microplastics	

over the exposure time, where DI represents the degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis.....91

Table S8. Summary of the analysis of variance (ANOVA) for the different Cu concentrations, where df represents the degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis..91

Table S9. Analysis of Variance (ANOVA) results for mortality of *Nitocra* sp. exposed to pristine and photodegraded microplastics (MPs). Where df represents degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis.....92

Table S10. Analysis of Variance (ANOVA) results for mortality of *Nitocra* sp. exposed to microplastics (MPs) and copper (Cu). Where df represents degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis.....92

Table S11. Analysis of Variance (ANOVA) results for mortality of *Nitocra* sp. exposed to different maturities of isolated plastispheres and associated with Cu. Where df represents degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis..... 92

Table S12. Monitoring of Cu concentrations ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) via Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) in toxicity tests with Polycarbonate (PC) microplastics (MPs). Values are expressed as mean and standard error for the initial and final times (96 hours).....93

Lista de Acrônimos e Abreviações

A

ANOVA - Análise de variância

B

BPA - Bisfenol A

C

CL50 - Concentração Letal 96 horas

COI - Citocromo oxidase subunidade I

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cu - Cobre

D

DSS - Dodecil Sulfato de Sódio

E

EPS - Substâncias poliméricas extracelulares

F

FTIR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

I

ITS - Espaçador Transcrito Interno

K

kHz - Quilohertz

kV - Quilovolt

M

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MPs - Microplásticos

P

PC - Policarbonato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

R

rRNA - RNA ribossômico

U

UV - Ultravioleta

Resumo

A poluição por microplásticos representa uma ameaça complexa aos ecossistemas estuarinos, atuando como um cenário de múltiplos estressores que integra degradação física e colonização biológica. Este estudo investigou o impacto da fotodegradação e da sucessão ecológica da plastisfera na toxicidade de microplásticos de polycarbonato (PC) para o copépode harpacticóide *Nitocra* sp., considerando a interação com o cobre (Cu) como contaminante associado. Microplásticos de PC foram submetidos a fotoenvelhecimento artificial (UV) por 30 horas, equivalente a aproximadamente 174 dias de exposição ambiental (São Paulo, Brasil). A caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Micro Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) revelou que a fotodegradação aumentou significativamente a rugosidade superficial e a reatividade química das partículas através da formação de novos grupos carbonila (C=O). A formação da plastisfera foi monitorada por 30 dias em condições controladas utilizando inóculo ambiental. Os resultados demonstraram uma sucessão ecológica dinâmica: enquanto o Cu inibiu inicialmente a densidade bacteriana (até o dia 10), a maturação da plastisfera (30 dias) resultou em uma recuperação acentuada, atingindo densidades de 4.325 ± 80 células mm^{-2} superiores à plastisfera isolada. A análise de *metabarcoding* (16S, 18S e ITS) indicou que o cobre atuou como um filtro seletivo, favorecendo gêneros metal-tolerantes como *Alteromonas*. Em contraste, a biomassa algal (clorofila-*a*) sofreu uma redução significativa no trigésimo dia sob exposição ao metal, indicando toxicidade tardia sobre a comunidade fotossintetizante. Ensaio de ecotoxicidade aguda (96h) revelaram que a maturação da plastisfera altera a biodisponibilidade do contaminante. Embora a matriz biológica tenha reduzido as concentrações de Cu dissolvido na água, funcionando como um sumidouro do metal, a exposição combinada aumentou a mortalidade de *Nitocra* sp. Este fenômeno sugere que a plastisfera madura concentra o metal na superfície da partícula, tornando esta mais tóxica, bem como um vetor químico mais potente para organismos detritívoros. Os resultados enfatizam que o risco ecológico dos microplásticos não deve ser avaliado apenas pelo polímero prístino, sendo a integração entre a

fotodegradação e a evolução biológica da plastisfera, determinante para o destino e o efeito desses poluentes no compartimento bentônico.

Palavras-Chave: Biodisponibilidade, Ecotoxicologia, Fotodegradação, *Nitocra*, Policarbonato.

Abstract

Microplastic pollution represents a complex threat to estuarine ecosystems, acting as a multiple stressor scenario that integrates physical degradation and biological colonisation. This study investigated the impact of photodegradation and plastisphere ecological succession on the toxicity of polycarbonate (PC) microplastics to the harpacticoid copepod *Nitocra* sp., considering the interaction with copper (Cu) as an associated contaminant. Characterisation by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) revealed that photodegradation significantly increased the surface roughness and chemical reactivity of the particles through the formation of new carbonyl groups (C=O). Plastisphere formation was monitored over 30 days. The results demonstrated a dynamic ecological succession: whilst Cu initially inhibited bacterial density (up to day 10), plastisphere maturation (30 days) resulted in a marked recovery, reaching densities of $4,325 \pm 80$ cells mm⁻² greater than those of the isolated plastisphere. *Metabarcoding* analysis (16S, 18S and ITS) indicated that copper acted as a selective filter, favouring metal tolerant genera such as *Alteromonas*. In contrast, algal biomass (chlorophyll-*a*) underwent a pronounced reduction on day 30 under metal exposure, indicating delayed toxicity on the photosynthetic community. Acute ecotoxicity assays (96 h) revealed that plastisphere maturation alters contaminant bioavailability. Although the biological matrix reduced dissolved Cu concentrations in the water column, functioning as a metal sink, combined exposure increased the mortality of *Nitocra* sp. This phenomenon suggests that the mature plastisphere concentrates the metal on the particle surface, transforming the microplastic into a toxicity hotspot and a more potent chemical vector for detritivorous organisms. The results emphasise that the ecological risk posed by microplastics cannot be assessed solely on the basis of the pristine polymer, as the interplay between physical ageing and the biological evolution of the plastisphere is a determining factor in the fate and effects of these pollutants within the benthic compartment.

Keywords: Bioavailability, Ecotoxicology, *Nitocra*, Photodegradation, Polycarbonate.

Prefácio

A proliferação de resíduos sintéticos no Antropoceno transformou os oceanos em depósitos de poluentes persistentes. Ao longo da minha trajetória acadêmica na pós-graduação, a observação desse cenário despertou meu interesse em compreender a evolução química e biológica dessas partículas no meio aquático. A percepção de que os microplásticos interagem dinamicamente com a radiação solar e microrganismos constituiu o ponto de partida para a execução desta pesquisa.

No Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática CONECO, a vivência prática permitiu constatar que o risco ecológico dos polímeros não deve ser avaliado unicamente por meio do material prístino. A verdadeira fronteira do conhecimento reside na compreensão da plastisfera e do intemperismo. Esse entendimento motivou a escolha do policarbonato, um plástico de engenharia que se desloca para o compartimento bentônico devido à sua densidade, etapa simulada para refletir o intemperismo que antecede a

colinização aquática. Investigar o efeito combinado da fotodegradação por radiação ultravioleta e a colonização microbiológica permitiu simular em laboratório as condições de exposição a longo prazo.

A complexidade desta dissertação expandiu-se ao integrar múltiplos estressores, associando o microplástico envelhecido ao cobre. A escolha desse metal justifica-se por sua relevância socioambiental e econômica no Estuário da Lagoa dos Patos, região pressionada por efluentes urbanos, insumos da lavoura e pelo tráfego portuário que lixivia o metal de tintas anti-incrustantes. Avaliar se a plastisfera atua como um vetor químico ativo capaz de concentrar esse metal, aumentando a toxicidade das partículas, tornou-se o foco deste trabalho na interface água-sedimento.

A condução deste estudo exigiu superar importantes desafios metodológicos e logísticos. Do monitoramento diário dos cultivos do copépode *Nitocra* sp., cuja complexidade taxonômica local restringe a resolução ao nível de gênero, à identificação genética da linhagem por biologia molecular, cada etapa demandou rigor técnico para garantir a reprodutibilidade dos ensaios ecotoxicológicos. Essa abordagem integrada permitiu traduzir de forma robusta os impactos reais dos poluentes na base da teia trófica estuarina. Com a conclusão deste trabalho, espera-se que as evidências preencham lacunas teóricas importantes na ciência ambiental e na oceanografia brasileira. Mais do que atender aos requisitos acadêmicos da pós-graduação, este estudo almeja aprimorar ferramentas de diagnóstico ecotoxicológico, auxiliando na formulação de estratégias de manejo costeiro e na conservação dos ecossistemas estuarinos, que figuram entre os ambientes mais produtivos e vulneráveis do planeta.

Capítulo I: Introdução

O desenvolvimento dos materiais plásticos teve início no começo do século XX, com a síntese da baquelite em 1907, considerada o primeiro polímero totalmente sintético [Baekeland, 1909]. Nas décadas de 1930 e 1940, houve avanço significativo na química dos polímeros, resultando na descoberta e consolidação da maioria dos materiais plásticos atualmente utilizados em escala industrial [Amaral-Zettler et al., 2020]. No período subsequente à Segunda Guerra Mundial, a intensificação da produção industrial e a redução dos custos de manufatura, favoreceram a ampla disseminação desses materiais junto à população, sobretudo na forma de produtos descartáveis, de baixo custo e destinados ao uso único. A partir da década de 1970, os plásticos consolidaram-se como os materiais mais utilizados globalmente em diversos setores produtivos. Paralelamente à intensificação da produção e do consumo, surgiram os primeiros registros científicos da presença de resíduos plásticos no ambiente

marinho, sendo 1972 marcado pela publicação pioneira que documentou sua ocorrência nos oceanos [Carpenter & Smith, 1972], estabelecendo as bases para investigações subsequentes sobre seus impactos ambientais.

A ampla disseminação dos materiais plásticos está diretamente relacionada à versatilidade de suas propriedades físico-químicas, como a elevada resistência mecânica, durabilidade e reduzido custo de produção [Arpia et al., 2021]. Entretanto, apesar das iniciativas voltadas à ampliação da coleta e da reciclagem desses materiais, estima-se que aproximadamente 8 milhões de toneladas de resíduos plásticos sejam introduzidas anualmente no ambiente marinho, provenientes tanto de fontes terrestres quanto de atividades desenvolvidas no próprio meio marinho [Jambeck et al., 2015]. Microplásticos são definidos como partículas com dimensões entre 1 μm e 5 mm [Hanvey et al. 2017]. Estas partículas podem ser classificadas conforme a sua origem, sendo os microplásticos primários são produzidos intencionalmente para aplicação direta em produtos industriais, comerciais ou de higiene pessoal, como *pellets* e microesferas de cosméticos. A presença dessas formas granulares no ecossistema gerou um alerta global e, em reconhecimento ao perigo que os grânulos de plástico representam para o ambiente marinho e aos derrames relatados em todo o mundo [Rubesinghe et al., 2022]. Estima-se que cerca de 445 mil toneladas de *pellets* entrem no meio ambiente a cada ano, principalmente por perdas logísticas [Galgani & Rangel Buitrago, 2024]. Ao ingressarem no ambiente aquático, essas partículas atuam como vetores complexos de poluição, demonstrando uma alta capacidade de adsorver e concentrar contaminantes químicos da água circundante, incluindo metais-traço

[Holmes et al., 2012, Mato et al., 2001]. Em contrapartida, os microplásticos secundários resultam do intemperismo e da fragmentação de resíduos plásticos maiores, como garrafas e embalagens, que, ao sofrerem processos de degradação no ambiente aquático, tornam-se fragmentos microscópicos [Moyal et al., 2023]. Essa distinção entre origens e tipos de microplásticos pode ser visualizada na Figura 1.

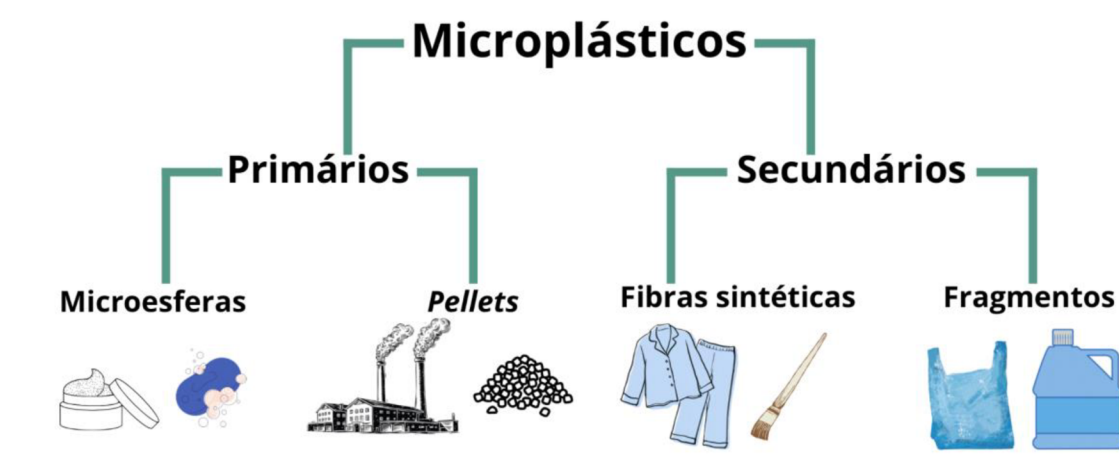


Figura 1. Representação esquemática da classificação de microplásticos conforme sua origem, distinguindo partículas primárias e secundárias. Fonte: Baseado em Moyal et al., 2023.

Os processos degradativos podem ser categorizados conforme o agente desencadeador, conforme ilustrado na Figura 2. Esta representação esquemática organiza a degradação em duas vias principais: abiótica, que engloba a fotodegradação, degradação térmica, química e física; e biótica, que compreende a degradação biofísica e bioquímica, mediada por atividade enzimática e microbiana. Dentre os mecanismos integrantes da via abiótica, destacam-se a degradação térmica, promovida por variações de temperatura, a hidrólise decorrente da interação com moléculas de água e a degradação mecânica, resultante de forças físicas como abrasão e atrito. No contexto dos

detritos plásticos marinhos, ressaltam-se especialmente a biodegradação, mediada pela atividade microbiana, e a fotodegradação, induzida pela radiação ultravioleta (UV) solar. Adicionalmente, a formação de biofilmes sobre os microplásticos pode modificar significativamente sua dinâmica degradativa, atuando como barreira física que reduz a incidência direta de radiação UV na superfície das partículas [Luo et al., 2022].

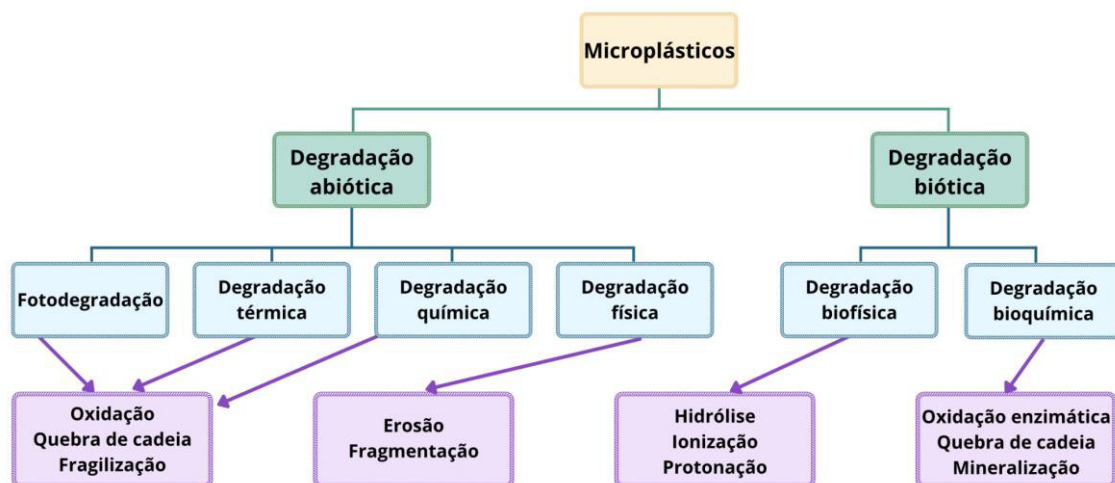


Figura 2. Resumo esquemático dos processos gerais envolvidos na degradação de microplásticos, diferenciando as vias abióticas e bióticas. Fonte: Baseado em Luo et al., 2022.

A degradação dos materiais plásticos no ambiente marinho ocorre por meio de uma combinação de mecanismos que alteram a integridade estrutural do polímero. O processo é iniciado pela foto oxidação induzida pela radiação ultravioleta solar, sendo influenciado por fatores ambientais determinantes, como o pH e a presença de metais-traço, que podem atuar como catalisadores na oxidação do polímero. Esta exposição promove alterações estruturais na matriz polimérica, resultando em diminuição da cristalinidade, redução da massa molecular e incorporação de produtos contendo oxigênio. Tais modificações

físicas culminam em danos estruturais significativos, como fissuras, fragmentação macroscópica e desgaste da superfície, que ampliam a área específica das partículas [Andrady et al., 2022]. Esse aumento na rugosidade favorece a adsorção de compostos orgânicos e nutrientes dissolvidos [Oberbeckmann et al., 2015], criando condições propícias para o estabelecimento de comunidades microbianas e a subsequente formação de biofilmes estruturalmente complexos nas superfícies plásticas expostas ao ambiente [Andrady et al., 2022]. Em paralelo, a degradação enzimática atua de forma seletiva sobre o material, com o auxílio de enzimas específicas que variam conforme a suscetibilidade do polímero, promovendo a despolimerização. A convergência entre estes processos físicos, químicos e biológicos resulta na fragmentação progressiva das partículas, tornando fundamental a compreensão desses mecanismos para elucidar o destino ambiental e os efeitos ecológicos dos microplásticos.

1.1 Processos de Colonização Microbiana e a Formação da Plastisfera

A sucessão ecológica sobre polímeros sintéticos tem início com o biofilme, definido como uma camada inicial microscópica formada por microrganismos envolvidos em uma matriz protetora [Flemming et al., 2010]. Essa dinâmica sucessional abrange desde as fases iniciais de colonização e seleção até o estabelecimento da Plastisfera com maturação completa (Figura 3).

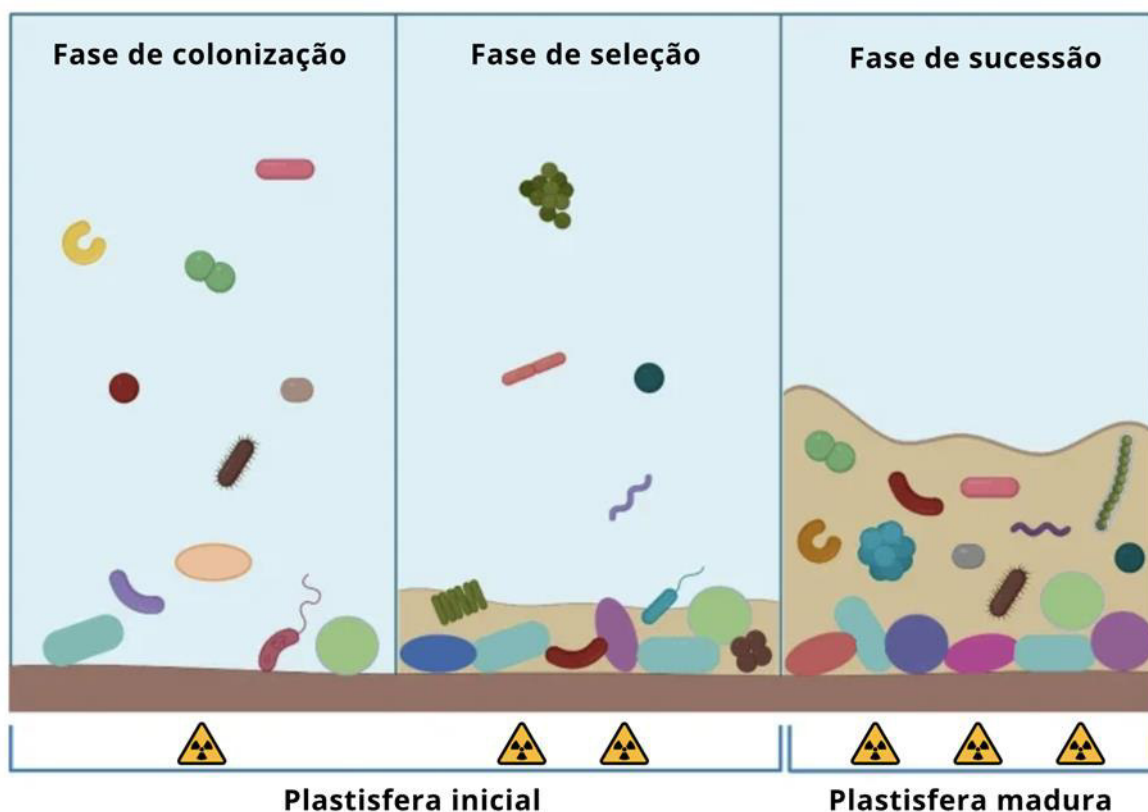


Figura 3. Representação esquemática das fases de colonização e sucessão microbiana na superfície de microplásticos, destacando a transição da plastisfera em estágio inicial de maturação até a plastisfera em estágio avançado de maturação e o seu papel como vetor de contaminantes. Fonte: Adaptado de Dey et al., 2022.

A Figura 4 esquematiza o processo em quatro estágios cronológicos distintos: a adesão reversível (1), mediada por forças de Van der Waals e estruturas celulares, a adesão irreversível (2), consolidada por ligações iônicas e de hidrogênio, a formação da estrutura do biofilme (3) e a dispersão celular (4), que pode ocorrer devido ao esgotamento de nutrientes.

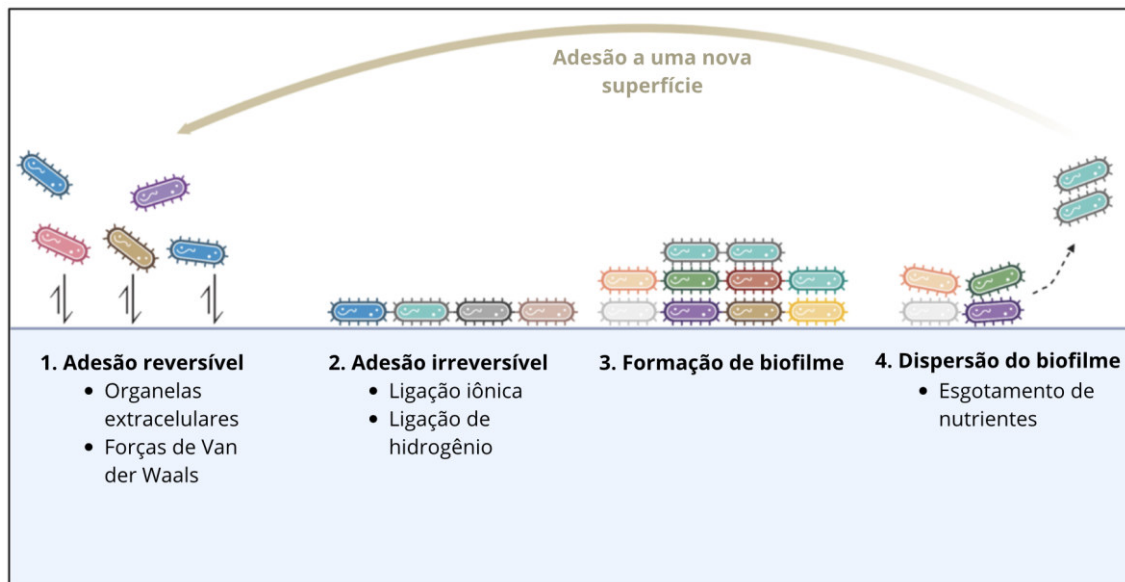


Figura 4. Processo de formação de biofilme na superfície de micropartículas.

Fonte: Adaptado de Moyal et al., 2023.

A formação dessa estrutura ocorre de maneira imediata assim que as partículas plásticas entram em contato com meio aquático, momento em que moléculas orgânicas dissolvidas são prontamente adsorvidas à superfície do polímero [Berman & Passow, 2007, Benner & Passow 2024]. Essa deposição pioneira estabelece uma película condicionante essencial que serve como base para a fixação inicial e a colonização subsequente por bactérias e outros microorganismos. Esta estrutura é sustentada pela produção da matriz polimérica extracelular, frequentemente referida pela sigla EPS (do inglês *extracellular polymeric substances*), que consiste em uma complexa mistura de polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos secretados pelos microorganismos, atuando como um adesivo estrutural que mantém a comunidade unida [Dey et al., 2022, Chen et al., 2025]. Conforme detalhado por Sauer et al., 2022, a formação destes consórcios biológicos ocorre por meio de mecanismos diversos: enquanto o modelo de biofilme associado a superfícies

descreve um processo sequencial de adesão celular seguido por crescimento clonal e produção ativa de EPS, a formação de agregados na fase líquida pode ocorrer por vias alternativas. Tais vias incluem o desprendimento de agregados a partir de biofilmes superficiais, o crescimento planctônico de células, mecanismos de autoagregação ou coagregação celular, e a agregação mediada por polímeros ambientais, seja por dispersão de fase ou por mecanismos de ponte polimérica que integram células e polímeros em uma matriz coesa [Sauer et al., 2022]. Esta matriz não funciona apenas como suporte físico, mas como um ambiente que confere proteção contra estresses ambientais, facilita a comunicação celular e regula a difusão de nutrientes, sendo o componente fundamental para a estabilidade destas comunidades.

O processo de colonização microbiana avança com o desenvolvimento e a maturação do biofilme que estabelece as condições químicas e biológicas determinantes na interface do material. Esse acúmulo de matriz orgânica e microrganismos altera de forma progressiva as propriedades originais do polímero, modificando a sua densidade rugosa e hidrodinâmica [Ghiglione et al., 2023]. A consolidação dessa comunidade microbiana na superfície do plástico representa um marco crítico pois o material deixa de se comportar de forma inerte e passa a atuar como uma interface biologicamente ativa. Essa modificação altera o equilíbrio das interações ambientais, influenciando diretamente a flutuabilidade, o tempo de permanência do material na coluna de água e a sua posterior deposição no sedimento [Kuwaie et al., 2026].

A culminância de todos esses processos de sucessão biológica resulta na formação da plastisfera, conceituada como o ecossistema que se desenvolve

sobre a superfície de plásticos em ambientes aquáticos com colonização diversa [Zettler et al., 2013]. Diferente de um simples agregado biológico, a plastisfera é reconhecida como um novo habitat oceânico, um nicho ecológico autônomo que sustenta comunidades microbianas e faunísticas altamente distintas das que habitam a água livre ou substratos naturais [Amaral-Zettler et al., 2020, Wright et al., 2020]. Este ecossistema é dinâmico e capaz de atuar como um vetor de dispersão para espécies invasoras e patógenos, além de reconfigurar fluxos biogeoquímicos locais. A complexidade da plastisfera é, portanto, o resultado direto da capacidade do plástico de persistir no ambiente e de fornecer uma superfície rígida e estável para a colonização em vastas regiões oceânicas onde o suporte natural é escasso [Moraes et al., 2025]. Ao integrar a formação do biofilme e a sucessão até a bioincrustação, modificando a densidade das partículas e acelerando a exportação de carbono orgânico para o sedimento, a plastisfera redefine a compreensão sobre os impactos da poluição sintética, demonstrando que os materiais plásticos estão alterando ativamente a estrutura da biodiversidade marinha global [Moyal et al., 2023].

1.2 A Interface Química dos Microplásticos e a Ecotoxicologia do Cobre

A maturação da plastisfera representa um processo temporal dinâmico que altera profundamente as propriedades de interface dos microplásticos ao longo do período de exposição marinha, introduzindo e acumulando grupos funcionais oxigenados na superfície do polímero. Essas modificações superficiais, somadas à presença contínua de substâncias poliméricas extracelulares secretadas pela comunidade microbiana, aumentam de forma significativa a afinidade química da partícula por contaminantes diversos, destacando-se a atração por metais-traço

como o cobre (Cu). Sob uma perspectiva físico-química ampla, a dinâmica que rege os microplásticos associados a comunidades biológicas como vetores preferenciais de elementos metálicos, é pautada por uma teia multifatorial de condicionantes do meio e da própria partícula. O fenômeno de sorção na interface do polímero com o biofilme exhibe dependência do tempo de exposição aos contaminantes, do comportamento iônico do corpo hídrico receptor, da concentração de partículas sintéticas dispersas e da concentração basal de metais [Cao et al., 2021, Liu et al., 2021]. Da mesma forma, determinantes físico estruturais, incluindo a dimensão geométrica do fragmento e seu grau de intemperismo, exercem influência direta na capacidade de retenção [Cao et al., 2021, Liu et al., 2021]. Com o desenvolvimento da sucessão ecológica na plastisfera, a secreção contínua de polímeros exocelulares cria microambientes tridimensionais dotados de alta porosidade e cargas superficiais modificadas, o que incrementa drasticamente os pontos de ancoragem e a afinidade química por cátions dissolvidos [Cao et al., 2021].

O cobre se apresenta como um elemento de extrema relevância ecotoxicológica em ecossistemas costeiros devido a sua marcada dualidade biológica. Em escalas microambientais basais, esse elemento é categorizado como um micronutriente fundamental para a fisiologia de organismos marinhos, atuando como cofator em processos enzimáticos primários e integrando a arquitetura molecular da hemocianina, proteína respiratória vital para a sobrevivência de invertebrados [Pilson, 2013]. Em contrapartida, o limiar homeostático que separa a necessidade metabólica da toxicidade aguda é extremamente tênue, fazendo com que pequenas elevações nas cargas biodisponíveis disparem disfunções

fisiológicas severas em uma ampla gama de organismos marinhos [Millero et al., 2009].

Sob a ótica regulatória vigente no Brasil, a Resolução CONAMA número 357 de 2005, estipula que a concentração máxima admissível de cobre na forma dissolvida para águas salobras é de 5 µg/L [CONAMA 2005]. Na natureza, matrizes estuarinas de caráter pristinas, manifestam teores de fundo reduzidos, tipicamente situados entre 0,5 e 2,0 µg/L [Palomo et al., 2026], ao passo que regiões costeiras submetidas a pressões urbanas e industriais exibem aportes substanciais que elevam esses índices para patamares entre 5,0 e 20,0 µg/L [Rodrigues et al., 2024], extrapolando com frequência os limites legais.

No gradiente dinâmico do Estuário da Lagoa dos Patos, essa contaminação é alimentada por rotas antrópicas distintas. O vetor de maior relevância pontual [Marreto et al., 2017] associa-se ao tráfego marítimo e às infraestruturas portuárias, cenários onde o metal é continuamente liberado devido ao desgaste e lixiviação de revestimentos anti-incrustantes empregados nos cascos de frotas comerciais e pesqueiras com o propósito de mitigar o assentamento biológico. Simultaneamente, o estuário atua como receptor de bacias hidrográficas expostas a intenso manejo agrícola, coletando fluxos difusos provenientes do escoamento superficial de lavouras continentais que carregam defensivos fitossanitários e corretores de solo enriquecidos com compostos cúpricos. O conjunto de processos que rege esse comportamento, abrangendo desde a oxidação e fragmentação inicial até a maturação da plastisfera e a subsequente capacidade de adsorção de contaminantes via interações eletrostáticas, ligações

de hidrogênio e interações pi, caracteriza o microplástico como um vetor químico ativo e um agente de toxicidade em ecossistemas aquáticos (Figura 5).



Figura 5. Esquema dos processos de intemperismo, formação de biofilme, adsorção de contaminantes e potencial de toxicidade associado a microplásticos. Fonte: Baseado em Luo et al., 2022.

Este fenômeno transforma o resíduo plástico em um vetor químico de elevada potência, frequentemente superando a capacidade de transporte da partícula pristina, uma vez que a matriz biológica atua como um mecanismo ativo de captura que intensifica o efeito sinérgico. Estudos demonstram que, em zonas costeiras, o biofilme estabelecido pode funcionar como um reservatório eficaz que estabiliza metais como o Cu na superfície da partícula, regulando sua disponibilidade [Wang et al., 2021]. Contudo, a biodisponibilidade deste metal não é estática e pode ser alterada conforme as variações nas condições físico-químicas do meio, como oscilações de pH e salinidade [Kuang et al., 2024]. Nessas variações ambientais, o cobre anteriormente adsorvido, pode se desassociar da matriz biológica e passar para a fase dissolvida na forma iônica, tornando-se mais facilmente assimilável pela biota e acelerando a transferência

através dos níveis tróficos. A deposição de polímeros densos no compartimento bentônico favorece a interação direta com metais-traço como o Cu, transformando o sedimento em um cenário de múltiplos estressores para a biota local [Djaoudi et al., 2022]. Essa interação é particularmente relevante dado que o compartimento bentônico atua como o principal destino final e reservatório de metais-traço em ecossistemas estuarinos [Li et al., 2025].

Aprofundando a compreensão sobre a complexidade dessas interações estuarinas, a Figura 6 detalha as vias de ligação química e os fatores reguladores que governam a função do microplástico como vetor. Conforme ilustrado nesse modelo conceitual, a retenção de metais-traço ocorre de forma simultânea por meio de mecanismos de complexação de superfície, interações eletrostáticas e processos de precipitação de óxidos hidratados de ferro e manganês na interface da partícula. Esse complexo químico atua de forma integrada com os biofilmes e a matéria orgânica circundante, direcionando o contaminante para rotas de bioacumulação na biota. A eficiência dessa dinâmica vetorial é estritamente regulada por uma matriz multifatorial que envolve as propriedades do metal (tipo e concentração), as características estruturais do polímero (área superficial, granulometria, grupos funcionais e envelhecimento) e os condicionantes do ambiente marinho receptor, como salinidade, pH e a presença de substâncias húmidas.

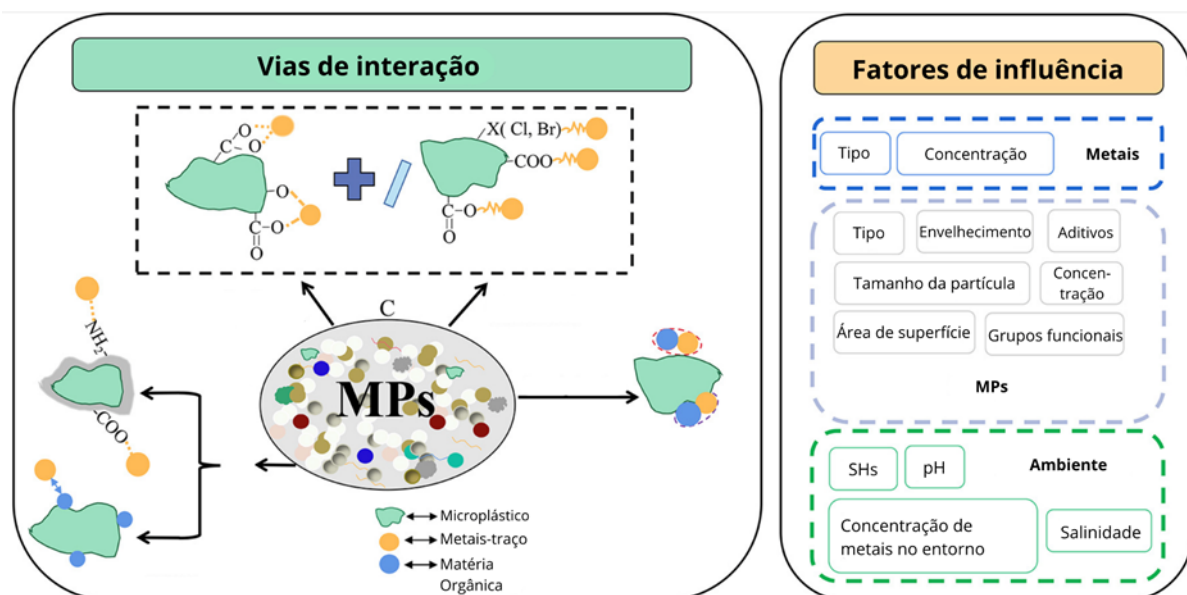


Figura 6. Esquema conceitual das vias de interação química e dos fatores ambientais e estruturais que influenciam o papel dos microplásticos como vetores de metais-traço em ambientes aquáticos. Fonte: Adaptado de Cao et al., 2021.

1.3 Particularidades do Policarbonato e Avaliação com Organismos-teste

O Policarbonato (PC) destaca-se por sua notável resistência mecânica e transparência, atuando como um substituto leve para vidros e metais em diversas aplicações [Alavi Nikje & Askarzadeh, 2013]. Como o Bisfenol A atua como unidade monomérica na estrutura do policarbonato, o composto pode estar presente como resíduo ou ser liberado durante a degradação, apresentando potencial toxicidade para humanos e organismos aquáticos [Pickett, 2011]. A exposição solar induz a degradação do material, uma vez que suas unidades monoméricas absorvem radiação UV, principalmente nos grupos éster e carbonato situados em posição alfa aos anéis aromáticos [Andrady et al., 2022, Redjala et al., 2020]. Esse processo desencadeia a ruptura de ligações

covalentes mediante reações fotolíticas e fotooxidativas, mecanismos que ocorrem simultaneamente no ambiente [Moustaghfir et al., 2020].

Embora a colonização biológica e a interação com contaminantes sejam processos inerentes à maioria dos polímeros sintéticos, o PC apresenta características particulares que o tornam um ponto de atenção para o compartimento bentônico. Devido à sua densidade superior à da água, essas partículas tendem a sedimentar e se acumular no substrato [Seewoo et al., 2024], expondo a fauna local a um cenário de múltiplos estressores. Essa convergência de interações físicas, químicas e biológicas é agravada pelas propriedades intrínsecas do PC, como sua alta resistência termomecânica e a presença de aditivos lixiviáveis [Atlas do Plástico 2020], consolidando-o como um modelo prioritário para estudos de risco ecológico.

Nesse sentido, a degradação fotooxidativa do PC resulta no cisalhamento de suas cadeias moleculares e em rearranjos que geram subprodutos como fenil salicilatos e grupos carbonílicos [Redjala et al., 2020]. Estes grupos atuam como sítios ativos de ligação de alta afinidade, aumentando substancialmente a capacidade de sorção de contaminantes metálicos. Estas alterações de natureza física e química elevam a porosidade e a reatividade da superfície, potencializando a função do microplástico como um vetor químico capaz de adsorver e concentrar contaminantes ambientais, elevando seu potencial tóxico para a biota [Djaoudi et al., 2022, Redjala et al., 2020].

Apesar de algumas informações levantadas, ainda pouco se sabe sobre como a interação entre microplásticos, plastisfera e metais se comporta e como esta combinação interage com a comunidade bentônica, especialmente em

ambientes estuarinos, que são considerados berçários para diversas espécies de importância ecossistêmica e econômica. Neste contexto, os copépodes harpacticóides epibentônicos são considerados elos vitais na teia trófica. Esta ordem abrange pequenos crustáceos com dimensões que variam de 0,2 a 2,5 mm de comprimento. No ambiente marinho, os harpacticóides se consolidam como o táxon quantitativamente mais importante entre os copépodes que compõem os ecossistemas bentônicos [Sarmiento e Santos, 2012]. Por serem detritívoros, estes organismos manipulam diretamente os microplásticos durante o comportamento alimentar, potencializando a exposição direta tanto ao polímero quanto aos seus aditivos e demais contaminantes adsorvidos na matriz da plastisfera. Diante dessa vulnerabilidade ambiental, o copépode estuarino *Nitocra* sp. (Ameiridae) desponta como um organismo-teste adequado para a realização de ensaios de toxicidade aquática.

Esses testes ecotoxicológicos constituem ferramentas indispensáveis, mas não suficientes, utilizadas globalmente por agências de proteção ambiental para avaliar a toxicidade de misturas complexas de contaminantes no meio ambiente [Versteeg et al., 1997, Wang et al., 2004]. No contexto de múltiplos estressores, esses ensaios funcionam como uma abordagem integrativa fundamental, sendo uma ferramenta capaz de traduzir como as interações químicas e biológicas afetam conjuntamente a resposta biológica. Essa classe de ensaios engloba uma variedade de modelos biológicos e pode ser categorizada em agudos ou crônicos, sendo estruturada para avaliar respostas como reprodução, crescimento e letalidade [Beyer et al., 2014]. Para que essa avaliação das interações seja ecologicamente representativa, a escolha do organismo-teste é crucial, exigindo uma espécie sensível que habite diretamente a interface onde

esses contaminantes se acumulam. O copépode estuarino *Nitocra* sp. é sistematicamente classificado no Reino Animalia, Filo Arthropoda, Subfilo Crustacea, Classe Maxillopoda, Subclasse Copepoda, Ordem Harpacticoida e Família Ameiridae [Mendonga et al., 2022].

Contudo, a identificação taxonômica baseada estritamente em critérios morfológicos apresenta limitações, o que configura uma lacuna de conhecimento significativa acerca da identidade genética das populações locais. Para suprir essa lacuna e assegurar a acurácia dos ensaios, é essencial a aplicação de ferramentas de identificação molecular, as quais são detalhadas na metodologia deste estudo. A escolha deste microcrustáceo se justifica por sua alta sensibilidade a contaminantes metálicos como o cobre, além de vantagens logísticas cruciais, como ciclo de vida curto e facilidade de manutenção de cultivos em laboratório. Assim, a utilização de *Nitocra* sp. permite avaliar de forma direta como a presença do microplástico e o amadurecimento da plastisfera modulam a toxicidade e a biodisponibilidade do cobre na coluna de água, gerando respostas sobre os impactos ecológicos desses estressores combinados.

Dessa forma, este estudo avança na fronteira do conhecimento ao integrar a avaliação ecotoxicológica com a caracterização da fotodegradação do policarbonato e a dinâmica da plastisfera. Compreender como essas alterações estruturais e biológicas moduladoras afetam a toxicidade do cobre em organismos estuarinos fornece subsídios teóricos e metodológicos essenciais para o monitoramento ambiental, preenchendo lacunas críticas sobre os

impactos reais de múltiplos estressores associados a resíduos plásticos em ambientes costeiros.

Capítulo II: Objetivos

OBJETIVO GERAL

Investigar a influência da Platisfera na toxicidade do lixiviado de microplásticos de Policarbonato isolados e/ou associados ao cobre, tendo o copépode *Nitocra* sp. como organismo-teste.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar a densidade e composição da comunidade presente na Platisfera;
- II. Avaliar a toxicidade aguda dos microplásticos (pristinos e fotodegradados) e do metal cobre, isolados ou combinados, para *Nitocra* sp.;
- III. Avaliar a influência da presença e maturação da Platisfera na toxicidade aguda dos microplásticos (isolados ou combinados ao metal).

Capítulo III: Material e Métodos

3.1 Microplásticos e Processo de Fotodegradação Artificial

Os experimentos foram conduzidos utilizando *pellets* de microplásticos constituídos de policarbonato (PC), transparentes, com dimensão aproximada de 5 mm e morfologia retangular levemente achatada. O material foi fornecido pelo Laboratório de Físico-Química Aplicada e Tecnológica (EQA/FURG) e empregado em sua forma original, não sendo submetido a etapas adicionais de preparo ou condicionamento prévio. Os microplásticos foram submetidos à radiação ultravioleta a fim de reproduzir, em escala experimental, o processo de intemperismo fotoquímico observado em condições ambientais. A exposição foi realizada em sistema de irradiação instalado em capela de exaustão, utilizando-se uma lâmpada de mercúrio policromática de 400 W, operada sem o bulbo de

vidro, durante 30 horas (Figura 7), conforme adaptação do protocolo descrito por Silva et al., [2023].



Figura 7. Montagem experimental para a exposição de microplásticos a radiação ultravioleta, utilizando lâmpada de vapor de mercúrio de 400 W sem invólucro externo.

Um total de 31,5 g de material (aproximadamente 1.200 partículas) foi distribuído em placas de Petri abertas, posicionadas a 25 cm da fonte luminosa. Após período de estabilização da lâmpada, de aproximadamente 15 minutos, as amostras permaneceram expostas por 30 horas com interrupções variadas. Ao longo da exposição, o material foi homogeneizado manualmente com espátula metálica a cada 1 hora, de modo a assegurar que todas as superfícies fossem

igualmente atingidas pela radiação incidente. As alterações na coloração resultantes desse processo podem ser observadas na Figura 8. De acordo com os cálculos apresentados no Material Suplementar, o período de irradiação adotado corresponde a aproximadamente 174 dias de exposição ambiental na cidade de São Paulo, variando entre 283 dias no solstício de inverno e 66 dias no solstício de verão de acordo com a metodologia de equivalência fotodegradativa [Silva et al., 2023].



Figura 8. Comparação visual entre microplásticos prístinos e fotodegradados após o período de exposição artificial.

3.1.1 Análise estrutural dos microplásticos a partir da Microscopia Eletrônica de Varredura

A investigação das alterações morfológicas superficiais induzidas pela exposição à radiação UV foi conduzida por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o equipamento modelo JSM-6610LV marca JEOL. Previamente à análise, as amostras foram submetidas à secagem em estufa (Ethiktechnology), a 40 °C por 48 horas, no Laboratório de Microcontaminantes

Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO/FURG), assegurando a remoção de umidade residual passível de interferir na qualidade das imagens. No Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL/FURG), as partículas foram montadas em suportes de alumínio com fita de carbono condutora e posteriormente metalizadas com fina camada de ouro, procedimento destinado a conferir condutividade elétrica adequada e minimizar artefatos de carregamento durante a aquisição das microfotografias. Os registros foram realizados em ampliações de 30× a 1000×, permitindo a análise da heterogeneidade da superfície dos microplásticos, a uma voltagem de aceleração de 10 kV em alto vácuo. Este procedimento metodológico permite caracterizar modificações morfológicas compatíveis com processos de degradação descritos na literatura [Silva et al., 2023].

3.1.2 Caracterização química dos microplásticos via espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Esta etapa experimental visou confirmar a identidade polimérica do material e mensurar, de forma qualitativa e quantitativa, as alterações moleculares induzidas pelo estresse fotooxidativo.

As análises foram conduzidas no modo de transmitância, utilizando o sistema de Micro Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) modelo IRTracer 100 da marca Shimadzu. Para cada amostra, foram realizadas 45 varreduras em um intervalo de comprimento de onda entre 750 e 5000 nm, com resolução espectral adequada para a identificação de picos característicos. O tratamento dos dados e a organização dos espectros resultantes foram processados utilizando a biblioteca LabSolutions IR, permitindo a extração dos comprimentos de onda de maior interesse.

A análise focou na identificação de bandas funcionais indicativas de degradação, com ênfase especial na região das carbonilas (entre 1250 a 1750 cm^{-1}). O aumento na intensidade destas bandas em relação aos picos de referência do polímero prístino, serviu como indicador primário da oxidação superficial. Esta abordagem permitiu correlacionar as modificações físicas observadas via microscopia com as transformações químicas ocorridas na matriz polimérica, validando a eficácia do protocolo de envelhecimento artificial adotado neste estudo.

3.2 Formação Experimental da Plastisfera

A colonização microbiana das partículas foi conduzida a partir de inóculo natural obtido por meio da coleta de água marinha a 1 m de profundidade, utilizando galões de 20 litros, em triplicata, na Praia do Cassino (32° 12' 24" S, 52° 10' 26" O) (Figura 9), sob temperatura de 19 °C e salinidade 16. A água coletada constituiu a fonte da comunidade multiespécies utilizada para a formação da plastisfera em laboratório, sob condições controladas. Foram estabelecidos seis tempos experimentais (0, 1, 5, 10, 15 e 30 dias), definidos de modo a representar estágios sucessivos do desenvolvimento do biofilme: superfície não colonizada (0 dias), adesão bacteriana inicial (1 dia), formação do biofilme primário (5 dias), transição para consórcio multiespécies (10 dias), maturação estrutural (15 dias) e bioincrustação avançada (30 dias). Essa abordagem permitiu acompanhar, de forma integrada, a dinâmica da sucessão ecológica associada à formação da plastisfera em ambiente controlado [Agostini et al., 2021, Ma et al., 2017, Sauer et al., 2022]. Ao término de cada período de exposição as partículas foram retiradas com auxílio de pinça dos béqueres de incubação e acondicionadas em

frascos de teste e frascos de conservação específicos para as suas respectivas análises de caracterização da comunidade aderida e subsequente realização dos ensaios de toxicidade. Os parâmetros físico-químicos da água (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e pH), cujos dados detalhados podem ser consultados no material suplementar, foram determinados no momento da coleta e monitorados ao longo de cada intervalo experimental com o auxílio de uma sonda multiparâmetros (Hanna Multi Parameters Edge HI2020 02), assegurando a manutenção das condições ambientais durante o processo de colonização.

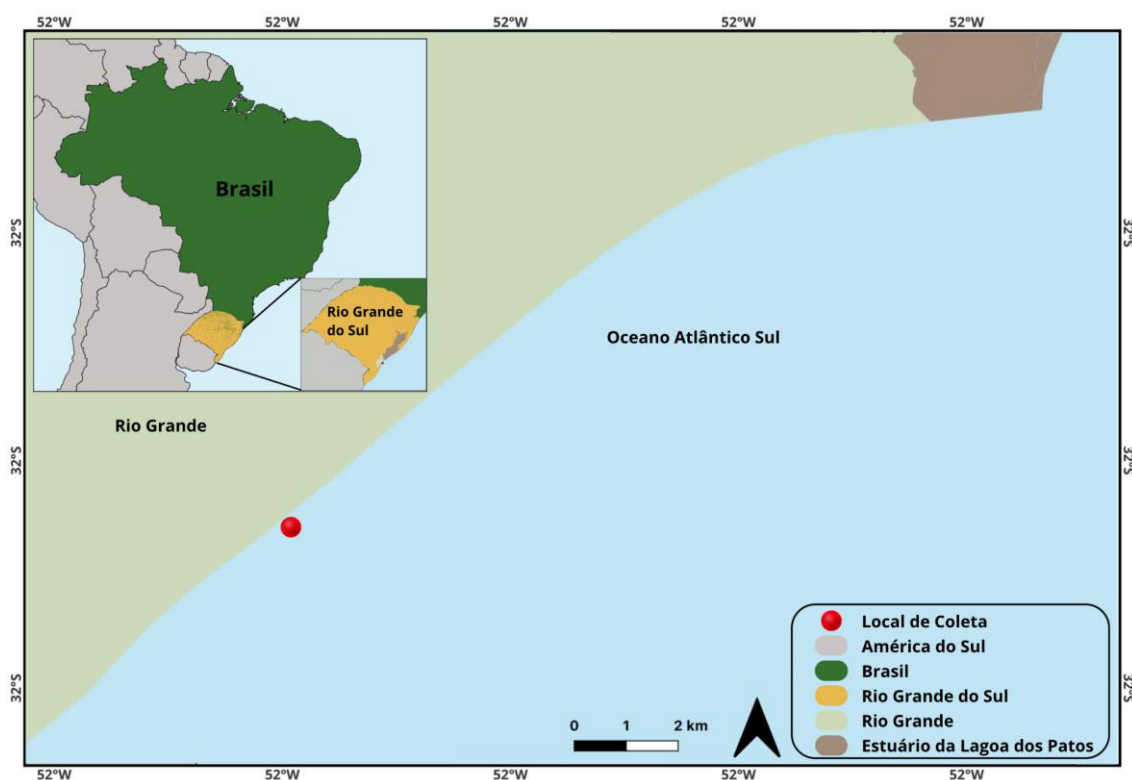


Figura 9. Localização do ponto de coleta na Praia do Cassino, Rio Grande, RS, local de obtenção do inóculo inicial utilizado nos ensaios experimentais.

3.3 Caracterização da *Plastisfera*

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A estrutura da comunidade aderida à plastisfera foi examinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), conforme adaptação metodológica de Agostini et al., [2021]. Após os períodos experimentais, os microplásticos foram recuperados, acondicionados individualmente em microtubos e processados segundo o protocolo descrito por Pinheiro et al., [2026]. As amostras foram previamente secas a 40 °C por 48 horas e, em seguida, acondicionadas em suportes de alumínio com fita de carbono condutora, sendo posteriormente metalizadas com fina camada de ouro, de modo a assegurar condutividade elétrica adequada e reduzir efeitos de carregamento. As microfotografias foram realizadas em microscópio JEOL JSM-6610LV (JEOL, Peabody, USA), operando sob condições padrão de alto vácuo a uma voltagem de aceleração de 15 kV. Para cada partícula, campos foram selecionados aleatoriamente. Considerando a heterogeneidade superficial induzida pela fotodegradação, adotou-se abordagem multiescalar, com uma imagem em baixa ampliação (30×) e três imagens em ampliações elevadas (100–2000×), permitindo a avaliação de feições microestruturais associadas ao envelhecimento superficial. A identificação morfológica dos organismos foi conduzida por comparação com registros disponíveis na literatura especializada [Masó et al., 2016, Ramsperger et al., 2020].

3.3.2 Densidade Bacteriana por Microscopia de Epifluorescência

A densidade bacteriana associada à superfície dos *pellets* foi estimada por microscopia de epifluorescência, conforme Agostini et al., [2021]. A biomassa aderida foi removida mediante sequência padronizada de desagregação física:

agitação em vórtex (30 s a 1.500 rpm), ultrasonicação (40 kHz por 2 min) e nova agitação em vórtex (30 s), promovendo a suspensão da plastisfera.

A fração resultante foi fixada com formol (4%) e glutaraldeído (1%) e mantida a 8 °C até o processamento. Alíquotas de 1 mL foram filtradas a vácuo em membranas Nuclepore (Whatman, Ø 25 mm, 0,2 µm), previamente escurecidas com Irgalan Black. Os filtros foram corados com Laranja de Acridina (0,1%), lavados, secos em temperatura ambiente e montados em lâminas permanentes.

As contagens foram realizadas em microscópio Zeiss Axioplan, sob aumento de 1000×, com seleção aleatória de trinta campos visuais por amostra. A quantificação celular foi conduzida no software ZEN Lite, conforme protocolo de Pinheiro et al., [2026].

3.3.3 Pigmentos Fotossintéticos

A determinação de pigmentos fotossintéticos foi realizada por espectrofotometria de absorção. Ao término de cada período experimental, as partículas colonizadas foram cuidadosamente recuperadas e imediatamente acondicionadas em solução salina estéril (0,9%), permanecendo sob refrigeração até o processamento analítico, a fim de preservar a integridade dos pigmentos fotossintéticos presentes na biomassa aderida. Para cada tratamento, conduzido em triplicata, alíquotas de 5 mL da suspensão contendo a fração biológica associada às partículas foram submetidas à centrifugação por 10 minutos, promovendo a sedimentação do material particulado. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante ressuspendido em 3 mL de metanol absoluto (100%), solvente orgânico amplamente empregado para a extração de clorofila. As amostras permaneceram sob extração a -14 °C por 24 horas, em condições

de baixa luminosidade, de modo a minimizar possíveis processos de degradação foto-oxidativa. Após o período de extração, as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para leitura espectrofotométrica. As absorbâncias foram determinadas nos comprimentos de onda de 665 nm e 750 nm, utilizando espectrofotômetro calibrado. A concentração de clorofila-a foi calculada conforme a equação proposta por Oleinski et al., [2026], com correção para turbidez a partir da leitura em 750 nm.

3.3.4 Caracterização Molecular da Comunidade

A composição taxonômica da comunidade associada à plastisfera foi avaliada por *metabarcoding*, utilizando amostras coletadas nos tempos de 1, 15 e 30 dias, incluindo tratamentos com microplásticos isolados, microplásticos associados ao cobre (Cu) e amostras da água inicial. O material foi armazenado em solução salina estéril (0,9%) até o processamento.

O sequenciamento dos marcadores 16S rRNA, ITS e 18S rRNA, direcionados à caracterização de bactérias, fungos, algas e invertebrados foi conduzido pela Neoprospecta Microbiome Tecnologia (Brasil). Amostras compostas foram obtidas pela homogeneização equitativa das três réplicas de cada tratamento. A amplificação e o sequenciamento foram realizados com profundidade aproximada de 100.000 leituras por amostra, empregando *primers* específicos para cada marcador molecular.

3.4 Organismo-Teste

3.4.1 Cultivo e Manutenção de *Nitocra* sp.

Os copépodes harpacticóides epibentônicos do gênero *Nitocra* sp. utilizados nos ensaios foram provenientes de uma cultura previamente estabelecida e mantida no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO). Os organismos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de vidro com capacidade nominal de 1 L, contendo 900 mL de água do mar artificial preparada com Instant Ocean Sea Salt®, ajustada à salinidade de 17 ± 1 . As culturas permaneceram sob temperatura controlada de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h claro:12 h escuro, condições mantidas constantes ao longo de todo o período experimental. A alimentação foi realizada duas vezes por semana mediante adição de $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ de uma solução nutritiva previamente homogeneizada, composta por ração para alevinos (Alcon®), levedura biológica (Fleischmann®) e água destilada [Lopes et al., 2025]. O monitoramento periódico das condições físico-químicas assegurou a estabilidade ambiental e a manutenção da viabilidade populacional do cultivo. A caracterização do ciclo de vida dos organismos mantidos sob essas condições laboratoriais foi documentada por meio de registros em microscópio óptico, permitindo a identificação detalhada dos distintos estágios de desenvolvimento da espécie (Figura 10). O ciclo biológico de *Nitocra* sp. tem início a partir da observação da fêmea ovada, progredindo para as fases larvais de náuplio e posteriormente copepodito, cujo desenvolvimento intermediário se estende por um período de cinco a sete dias. A maturação completa até o estágio adulto é consolidada em um intervalo de dezoito a vinte dias, evidenciando a viabilidade e o rápido crescimento populacional da linhagem sob o protocolo de manutenção adotado.

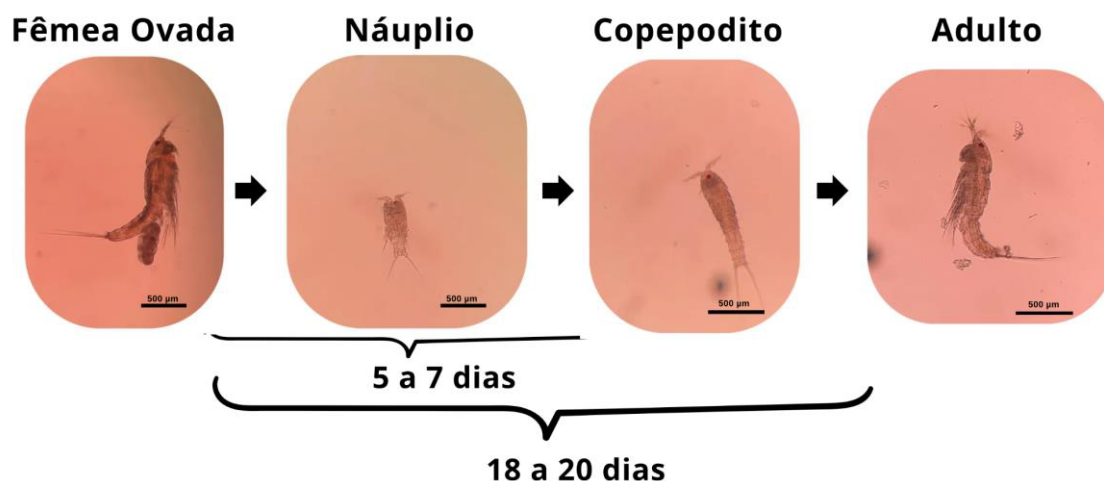


Figura 10. Representação esquemática do ciclo de vida do copépode harpacticóide *Nitocra* sp. obtida por meio de capturas em microscópio óptico. O esquema ilustra a transição cronológica entre os estágios de fêmea ovada, náuplio, copepodito e adulto, indicando o tempo de desenvolvimento inicial (5 a 7 dias) e o período total para a maturação completa (18 a 20 dias) sob condições controladas de laboratório. As barras de escala representam 500 µm. Adaptado de Lotufo & Abessa, 2002.

3.4.2 Identificação Genética

A avaliação taxonômica dos organismos foi realizada por meio de caracterização molecular. O DNA total foi extraído de cinquenta indivíduos inteiros cultivados em laboratório, utilizando protocolo baseado em precipitação com acetato de amônio conduzido em triplicata. Os produtos amplificados foram purificados por precipitação com acetato de sódio e etanol e subsequentemente sequenciados em analisador genético ABI PRISM® 3100 (Hitachi) na Universidade de São Paulo (USP). Os cromatogramas obtidos foram inspecionados, editados e alinhados no software Geneious® 9.5, a partir do qual se geraram sequências de consenso. A identificação específica foi realizada por comparação com

sequências disponíveis no GenBank (NCBI), e as sequências produzidas neste estudo foram devidamente depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information.

3.4.3 Carta Controle e Monitoramento da Sensibilidade

A saúde dos organismos cultivados foi acompanhada mensalmente por meio de ensaios de sensibilidade com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS), metodologia adaptada de Soroldoni (2017). Os testes seguiram o protocolo descrito por Lotufo e Abessa [2002], consistindo na exposição estática de indivíduos adultos, excluindo-se fêmeas ovadas durante 96 horas, sob fotoperíodo de 12C:12E h, temperatura de 25 °C, sem aeração e sem alimentação. Foram empregadas concentrações nominais crescentes de 4, 6, 8, 10 e 12 mg·L⁻¹ de DSS, com dez organismos por unidade experimental em triplicata. A concentração letal mediana (CL_{50-96h}) foi estimada a partir da mortalidade observada ao final do período de exposição, permitindo verificar a manutenção da sensibilidade do lote dentro dos limites historicamente estabelecidos para a espécie, conforme detalhado no material suplementar.

3.5 Delineamento Experimental dos Ensaios Ecotoxicológicos

3.5.1 Estrutura Geral dos Tratamentos

Os ensaios de toxicidade aguda foram conduzidos em sistema estático com duração de 96 horas, sem renovação das soluções e sem fornecimento de alimento, a fim de evitar interferências na biodisponibilidade dos agentes avaliados. Cada tratamento foi composto por triplicatas contendo dez organismos adultos por unidade experimental, além do respectivo controle

negativo. Ao término da exposição, a sobrevivência foi determinada por observação sob microscópio estereoscópico, sendo considerados mortos os indivíduos que apresentaram ausência completa de movimentos e de resposta a estímulo mecânico. Quando aplicável, a concentração letal mediana (CL_{50-96h}) foi estimada, nos casos em que não se observou gradiente adequado de resposta, os efeitos foram discutidos com base na mortalidade percentual absoluta.

3.5.2 Exposição a Microplásticos Prístinos e Fotodegradados

Nos ensaios envolvendo exclusivamente microplásticos, foram utilizados *pellets* translúcidos de policarbonato com aproximadamente 5 mm de diâmetro, em suas formas prístina e fotodegradada, conforme descrito previamente. Os organismos foram expostos a densidades de 0, 7, 10 e 24 *pellets* em 15 mL de água marinha artificial cujos valores foram definidos a partir de ensaios preliminares para cobrir uma faixa adequada de resposta biológica, mantendo-se as mesmas condições físico-químicas estabelecidas para o cultivo.

3.5.3 Exposição ao Cobre Isolado

Para os ensaios com cobre isolado, foi preparada uma solução estoque de cobre (II) na concentração nominal de 10 mg·L⁻¹ a partir da dissolução de cloreto de cobre di-hidratado (CuCl₂·2H₂O Dinâmica®) em solução salina artificial com salinidade 17, seguida de acidificação com 1% de ácido nítrico para estabilização dos íons em solução. As soluções de trabalho foram obtidas por diluição em água marinha artificial, resultando nas concentrações nominais de 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mg·L⁻¹, cuja seleção foi estabelecida com base na literatura [Ytreberg et al., 2010] e em testes preliminares, a CL_{50-96h} foi estimada por análise Probit. Todas as vidrarias utilizadas foram submetidas a um rigoroso protocolo de

descontaminação, realizado antes e após o uso das vidrarias. O material permaneceu imerso em solução de detergente (4%) por 24 h, seguido de banho em ácido nítrico (2,5%) pelo mesmo período. Posteriormente, as vidrarias foram lavadas com acetona (99%) e álcool etílico (95%) e, por fim, enxaguadas cinco vezes com água destilada.

3.5.4 Exposição Combinada

Os ensaios de exposição combinada foram realizados para avaliar possíveis interações entre microplásticos e cobre dissolvido. Nesses experimentos, os organismos foram expostos simultaneamente a *pellets* de policarbonato e às soluções de cobre nas mesmas concentrações nominais descritas anteriormente (triplicatas) por 96 horas, seguindo os mesmos procedimentos metodológicos adotados nos ensaios isolados.

Adicionalmente, *pellets* previamente colonizados por *plasticisfera*, nos diferentes tempos de incubação estabelecidos, foram utilizados para avaliar a mortalidade em ensaio agudo por 96 horas, tanto de forma isolada quanto em associação com cobre dissolvido. Essa abordagem permitiu investigar se a colonização biológica do polímero poderia modificar a resposta tóxica observada.

3.5.5 Efeito da *Plasticisfera* Isolada e Associada ao Cobre

Pellets previamente colonizados por *plasticisfera*, nos diferentes tempos de incubação, foram utilizados (5 unidades por réplica) para avaliação da mortalidade em ensaio agudo por 96 horas.

Adicionalmente, *pellets* colonizados foram expostos às soluções de cobre por 96 horas, permitindo avaliar possíveis modificações na toxicidade decorrentes da presença do biofilme.

3.6 Monitoramento Químico e Determinação Analítica do Cobre

Para a quantificação do cobre dissolvido, alíquotas de 10 mL foram coletadas nos tempos 0 e 96 horas, filtradas em membrana de 0,45 µm e acidificadas com ácido nítrico 1%, sendo mantidas sob refrigeração. A análise foi executada por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS). Visando minimizar interferências de matriz decorrentes da salinidade 17, as amostras foram submetidas a uma diluição de 50 vezes em água ultrapura contendo 1% de ácido nítrico. As medições ocorreram em triplicata, com dois ciclos de lavagem do injetor entre leituras, e a curva analítica foi estabelecida entre 0 e 5,0 µg L⁻¹, com limite de detecção do método fixado em 0,05 µg L⁻¹. O controle de qualidade incluiu brancos procedimentais e padrões de referência, com recuperação consistentemente superior a 90%.

3.7 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados a partir da média das três leituras obtidas para cada tratamento (triplicatas). A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de *Shapiro Wilk* ($p = 0,05$). Diferenças significativas na densidade bacteriana e nos pigmentos foram avaliadas por meio de ANOVA *one-way* e *two-way*, seguidas pelo teste de *Tukey* ($p = 0,05$). As análises estatísticas e as representações gráficas foram processadas no ambiente RStudio (v. 4.2.2). O processamento dos dados de *metabarcoding* envolveu a organização das planilhas de abundância taxonômica e o cálculo da abundância relativa dos grupos

microbianos predominantes. Estes dados subsidiaram a construção de mapas de calor (*heatmaps*), permitindo a identificação de padrões de sucessão biológica e as respostas da comunidade à exposição ao cobre. A manipulação de dados (*metabarcoding*, densidade bacteriana, clorofila-*a* e toxicidade) foi realizada via pacotes *readxl*, *dplyr* e *tidyverse*, enquanto os elementos gráficos e *heatmaps* foram padronizados com o auxílio dos pacotes *ggplot2*, *scales*, *RColorBrewer*, *ggpubr*, *grid* e *ggtext*. Adicionalmente, para os dados de mortalidade de *Nitocra* sp. (proporções), aplicou-se o Modelo Linear Generalizado (GLM) com distribuição quasibinomial e função de ligação *logit* para ajuste de sobredispersão, sendo as análises e as comparações múltiplas *post-hoc* conduzidas com o suporte dos pacotes *car*, *emmeans* e *multcomp*.

Capítulo IV: Artigo Científico

Para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Oceanologia, é requerido que o discente realize a submissão de pelo menos um artigo científico como primeiro autor em periódico com corpo indexado. Desse modo, os resultados da pesquisa desenvolvida durante o período de mestrado e a discussão dos resultados serão apresentados em forma de artigo neste Capítulo. O manuscrito, de autoria de Luana Peçanha dos Santos, Mikael Luiz Pereira Morales, Vanessa Ochi Agostini, Camila De Martinez Gaspar Martins, Maximiliano Manuel Maronna, Sanye Soroldoni e Grasiela Lopes Leães Pinho é intitulado “From Pristine to Biofouled: Microplastic Aging and Plastisphere Succession Shape Copper Toxicity in the Epibenthic Copepod *Nitocra* sp. (Boeck, 1865)” e encontra-se atualmente em revisão no periódico Marine

Pollution Bulletin. A formatação do texto, citações e referências estão de acordo com o solicitado pela revista.

From Pristine to Biofouled: Microplastic Aging and Plastisphere Succession Shape Copper Toxicity in the Epibenthic Copepod *Nitocra* sp. (Boeck, 1865)

Luana Peçanha dos Santos^{a,b*}; Mikael Luiz Pereira Morales^{a,b,c}; Vanessa Ochi Agostini^{b,f}; Camila De Martinez Gaspar Martins^d; Maximiliano Manuel Maronna^c; Sanye Soroldoni^{a,b}; Grasiela Lopes Leães Pinho^{a,b}.

^a Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática, Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Av. Itália, Km 8, Carreiros, CEP: 96203-900 - Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

^b Programa de Pós-graduação em Oceanologia (PPGO), Instituto de Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

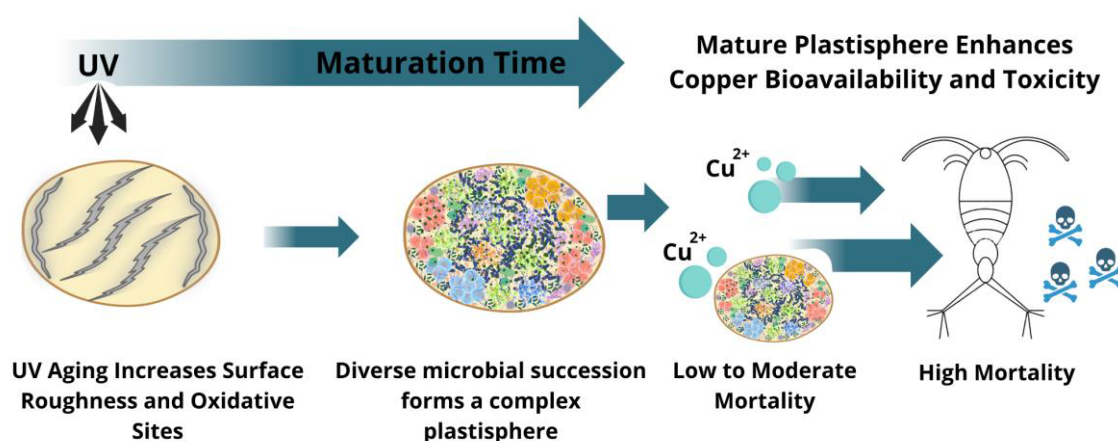
^c Programa de Pós-graduação em Oceanologia Biológica (PPGOB), Instituto de Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

^d Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

^e Programa Institucional de Pós-Doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PIPD-CAPES/PPGO).

^f Regenera Moléculas do Mar, Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 96D - Sala 210 - Partenon, Porto Alegre - RS, 90160-091.

Graphical abstract:



Abstract:

Microplastic pollution threatens estuarine ecosystems by acting as a multiple stressor scenario integrating physical degradation and biological colonisation. This study investigated the impact of photodegradation and plastisphere ecological succession on the toxicity of polycarbonate (PC) microplastics to the copepod *Nitocra* sp., considering its interaction with copper (Cu). PC particles were artificially photo aged (UV) for 30 hours,

equivalent to 174 days of environmental exposure. Scanning Electron Microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy revealed that photodegradation increased surface roughness and chemical reactivity through carbonyl group formation. Plastisphere development was monitored over 30 days. Results demonstrated a dynamic succession: while Cu initially inhibited bacterial density, plastisphere maturation (30 days) resulted in a recovery, reaching densities $4,325 \pm 80$ cells mm^{-2} greater than the isolated plastisphere. *Metabarcoding* analysis (16S, 18S, ITS) indicated that copper acted as a selective filter, favouring metal tolerant genera like *Alteromonas*. Conversely, algal biomass (chlorophyll-*a*) decreased significantly on day 30 under metal exposure. Acute ecotoxicity assays (96 h) revealed that plastisphere maturation alters contaminant bioavailability. Although the biological matrix reduced dissolved Cu in the water column, functioning as a metal sink, combined exposure increased *Nitocra* sp. mortality. This suggests the mature plastisphere concentrates metal on the particle surface, transforming the microplastic into a toxicity hotspot and a potent chemical vector for detritivorous organisms. Thus, ecological risk assessments cannot rely solely on pristine polymers, as the interplay between physical ageing and plastisphere evolution determines pollutant fate in the benthic compartment.

Keywords: Estuarine environments, Ecotoxicology, Benthic organisms, Metallic pollutants, Plastics.

1. Introduction

Since the early twentieth century, exponential plastic production and improper disposal have driven severe ecosystem transformations (Amaral-Zettler et al., 2020). In aquatic environments, waste fragmentation forms microplastics (1 μm to 5 mm) that readily interact with biota (Hanvey et al., 2017). When exposed to environmental conditions, these particles undergo photo-oxidation via ultraviolet (UV) radiation, the fastest abiotic degradation pathway (Andrady et al., 2022). This process triggers surface cracking and physicochemical alterations that increase polymer reactivity, nutrient adsorption (Oberbeckmann et al., 2016), and the surface area available for biological colonization.

This biological colonization is termed the plastisphere, a dynamic ecological succession where bacteria, algae, and fungi form a complex microbial community (Zettler et al., 2013). Initial colonizers produce an extracellular polymeric substance (EPS) matrix, consolidating biofilms (Flemming and Wingender, 2010). In aquatic ecosystems, this colonization progresses through predictable stages, beginning with rapid primary biofilm formation (Sauer et al., 2022) and advancing to a mature plastisphere (Agostini et al., 2021), where the biological matrix regulates the particle's physicochemical properties.

Plastisphere maturation and EPS presence introduce oxygenated functional groups, increasing the particle's chemical affinity for contaminants like copper (Cu) and transforming the plastic into a potent chemical vector (Djaoudi et al., 2022; Wang et al.,

2009). In coastal zones, biofilms function as reservoirs that stabilize metals on the particle surface, however, fluctuations in pH and salinity can cause adsorbed copper to dissociate into the dissolved phase, increasing its bioavailability. This interaction is critical in estuarine ecosystems, where the benthic compartment acts as the primary sink for trace metals (Li et al., 2025).

While these processes apply to various polymers, polycarbonate (PC) presents critical characteristics. Due to a density exceeding that of water, PC particles settle in the sediment (Seewoo et al., 2024), exposing local fauna to a multiple-stressor scenario. This risk is compounded by PC's high thermomechanical resistance, leachable additives like Bisphenol A (Atlas do Plástico, 2020), and photo-oxidative degradation, which causes chain scission that generates phenolic and carbonyl binding sites, further elevating sorption capacity and toxicity (Redjala et al., 2020).

Despite these insights, little is known about how the combination of microplastics, the plastisphere, and trace metals affects estuarine benthic communities. Epibenthic harpacticoid copepods are vital trophic links, as detritivores, they directly manipulate sedimented microplastics, enhancing exposure to the polymer, additives, and adsorbed contaminants. Therefore, this study aimed to investigate the toxicity of PC microplastics to the copepod *Nitocra* sp., evaluating the influences of photodegradation, plastisphere formation, and interaction with copper.

2. Methodology

2.1. Microplastics Preparation and Characterisation

2.1.1. Photodegradation

Commercial translucent polycarbonate (PC) microplastics, were subjected to an artificial photo-ageing process under controlled laboratory conditions. This stage was carried out in a fume cupboard equipped with a 400 W polychromatic mercury lamp with the outer bulb removed, enabling emission of radiation across multiple wavelengths (254, 278, 300, 310, 334, 363, 400, 435, 465, 544, 575, 624 and 728 nm). The microplastics were placed in glass Petri dishes, positioned 25 cm below the light source, and exposed to ultraviolet radiation for 30 hours following thermal stabilisation of the lamp (approximately 15 minutes). As the distribution of irradiated energy is non-homogeneous being more intense along the central axis and diminishing towards the edges the particles were manually homogenised at hourly intervals to promote uniform exposure to the incident radiation. This experimental protocol corresponds to approximately 174 days (ranging from 283 days at the winter solstice to 66 days at the summer solstice) of exposure to the mean solar radiation recorded for the city of São Paulo, Brazil, following the photodegradative equivalence methodology (Silva et al., 2023).

2.1.2. Microplastic Characterisation

2.1.2.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Analysis of surface heterogeneity required prior drying of the samples for 48 hours at 40 °C. This procedure was necessary to mitigate the interference of relative humidity and to ensure maximum resolution and sharpness of the resulting micrographs. Samples were subsequently mounted on aluminium stubs using carbon tape and sputter-coated with gold (Silva et al., 2023). Image acquisition consisted of one low-magnification micrograph (30×) and three high-magnification micrographs (between 100× and 2,000×) for each pristine and photodegraded sample (in triplicate). This procedure enabled the capture of microstructural variations relevant to the assessment of the surface photodegradation process.

2.1.2.2. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Pristine and photodegraded microplastics were analysed by FTIR in transmittance mode, with 45 scans covering wavelengths ranging from 750 to 5,000 nm, using a micro-FTIR system (IRTracer 100, Shimadzu). The resulting spectra were processed and the wavelengths of interest identified using the LabSolutions IR spectral library.

2.1.3. Plastisphere: Formation and Characterisation

2.1.3.1. Collection of Environmental Inoculum

Water samples were collected during spring at Cassino Beach, Rio Grande, RS, Brazil (32° 20' 65" S, 52° 17' 38" W). Samples were collected manually from the subsurface at approximately 1 m depth using 20 L containers, in triplicate, to minimise the influence of sediment resuspension in the surf zone. Physicochemical parameters (temperature, salinity, dissolved oxygen and pH) were measured using a multiparameter probe (Hanna Multi Parameters Edge HI2020-02) at the time of water collection and monitored throughout each exposure period (Table S4). The water temperature recorded in the field was 19 °C. However, for the execution of laboratory experiments, the temperature was gradually adjusted and maintained at 25°C to comply with the culture and exposure protocols for the copepod. To mitigate thermal discrepancies relative to the environmental inoculum and to ensure stable plastisphere succession, the substrates were subjected to gradual thermal acclimation until reaching the experimental temperature. The collected water was used to maintain the experimental systems, in which polycarbonate particles were kept under controlled conditions to allow plastisphere development. Following different periods of exposure to natural seawater (1, 5, 10, 15 and 30 days), the particles were collected for analysis of the established community and for toxicity testing. In continuation of the experimental design, particles from each incubation period were subsequently exposed to Cu solutions, following the procedures detailed in the subsequent sections.

2.1.3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The characterisation of the community present in the plastisphere was carried out by SEM, following the methodology adapted from (Agostini et al., 2021). Following the

exposure period, microplastics were separated and identified in Eppendorf tubes according to the methodology of (Pinheiro et al., 2026). Samples were dried for 48 hours at 40 °C, then mounted on aluminium stubs using carbon tape and sputter-coated with gold in accordance with standard procedures, following the methodology of (Silva et al., 2023). Samples were subsequently visualised by SEM (JEOL, JSM-6610LV, Peabody, USA). For each sample, one low-magnification micrograph (30×) and three high-magnification micrographs (between 100× and 2,000×) were obtained. Morphological structures were compared with SEM images from the literature, and organisms were identified based on their morphology (Ramsperger et al., 2020).

2.1.3.3. Bacterial Density

Bacterial density on microplastic surfaces was estimated by epifluorescence microscopy. Plastisphere extraction involved vortexing for 30 seconds at 1,500 rpm, ultrasonication at 40 kHz for 2 minutes, and vortexing again for another 30 seconds (Pinheiro et al., 2026). The suspension was fixed with 4% formaldehyde and 1% glutaraldehyde and stored at 8 °C (Agostini et al., 2021). A 1 mL aliquot, diluted 1:1 with distilled water, was vacuum filtered through a Nucleopore polycarbonate membrane (Whatman, Ø 25 mm, 0.2 µm pore size), previously stained with Irgalan Black. Filters were stained with 0.1% Acridine Orange, rinsed, air-dried, and mounted on glass slides. Slides were analysed by epifluorescence microscopy (Zeiss Axioplan) at 1,000× magnification, randomly selecting thirty visual fields. Bacteria were enumerated using ZEN lite software, and density was calculated as cells·mm⁻² (Pinheiro et al., 2026).

2.1.3.4. Photosynthetic Pigments

The analysis of photosynthetic pigments was carried out by absorption spectrometry. For each treatment, in triplicate, 5 mL aliquots were withdrawn and centrifuged for 10 minutes, after which the supernatant was discarded. Subsequently, 3 mL of methanol (100%) was added, and the material was refrigerated at -14 °C for 24 hours. Following this period, the samples were centrifuged again for 10 minutes, and the resulting supernatant was analysed by spectrophotometer at wavelengths of 665 and 750 nm. chlorophyll-*a* concentration was calculated in accordance with Oleinski et al., 2026.

2.1.3.5. Plastisphere Composition

Microbial, fungal, and eukaryotic community composition was assessed by *metabarcoding* using substrate samples collected at 1, 15, and 30 days. Analyses included treatments with microplastics (MPs) alone, MPs combined with copper (Cu), and environmental inoculum. Samples were stored in sterile 0.9% saline at -80 °C until processing. DNA extraction involved mechanical lysis with zirconia beads, followed by silica column purification based on guanidinium thiocyanate (in-house protocol adapted from Wang et al., 2009) using a Qiacube HT instrument. Sequencing of 16S rRNA, ITS, and 18S rRNA markers was performed by Neoprospecta Microbiome Technologies (Brazil).

Microbial community characterisation was performed by next generation sequencing (NGS) of amplicons targeting the 16S rRNA (V3–V4 region), 18S rRNA (V9 region) and ITS1/ITS2 markers. A complementary approach was employed for the characterisation of fungal communities: the 16S rRNA marker enabled characterisation of bacterial communities, whilst the 18S rRNA marker allowed mapping of the broader eukaryotic community (including algae and invertebrates), and the ITS marker provided the taxonomic resolution required for the Kingdom Fungi.

These markers captured fungal successional dynamics at different levels of resolution. Amplification was performed using primer sets 341F/806R (Wang et al., 2009), F-1183/R-1631 (Starke et al., 2026), and ITS1/ITS2 (Schmidt et al., 2013). Genomic libraries were prepared according to Neopropecta Microbiome Technologies (Brazil) proprietary protocols and sequenced on MiSeq platforms (Illumina Inc., USA). Bioinformatic processing followed the Sentinel pipeline (Neopropecta), with taxonomic analysis based on alignment algorithms against reference databases (Greengenes, SILVA, and UNITE), ensuring high-resolution identification of bacteria, fungi, and other eukaryotes.

2.2. Test Organisms

2.2.1. Culture and Maintenance of *Nitocra* sp. as a Test Organism

Epibenthic harpacticoid copepods (*Nitocra* sp.) were sourced from the Laboratory of Organic Microcontaminants and Aquatic Ecotoxicology (CONECO, FURG). Organisms were cultured in 1 L glass Erlenmeyer flasks containing 900 mL of artificial seawater (Instant Ocean Sea Salt®) at a salinity of 17 ± 1 , under controlled temperature (25 ± 1 °C) and a 12:12 h light:dark photoperiod (Lotufo and Abessa, 2002). The water was renewed every 15 days (Lopes et al., 2025). A temperature of 25 °C was maintained for optimal physiological performance, while substrates underwent gradual thermal acclimation to align with experimental conditions. Details regarding the control chart using SDS and culture health assessments are provided in the Supplementary Material. Organisms were fed twice weekly with 2 mL of a food solution (100 mL distilled water, 1 g Alcon® fish feed, 0.5 g Fleischmann® yeast) per litre of culture (Lopes et al., 2025).

2.3. Acute Toxicity Assays

The acute toxicity assay was conducted under controlled laboratory conditions, using adult male organisms distributed across experimental triplicates of 10 individuals each, alongside a control treatment. Exposure was carried out under static conditions in glass vial flasks (total volume 10 mL) over a period of 96 hours, without test solution renewal and without food provision, to avoid interference with the bioavailability of the compounds under evaluation (Lotufo and Abessa, 2002; Lopes et al., 2025). At the end of the exposure period, organism survival was quantified by direct observation under a stereoscopic microscope; individuals exhibiting complete absence of movement and no response to mechanical stimuli were considered dead, thereby enabling determination of

the median lethal concentration for 50% of the organisms (LC₅₀). The test conditions for each experiment are specified below.

2.3.1. Pristine versus Photodegraded Microplastics

The experimental design consisted of exposing organisms to densities of 0, 7, 10 and 24 particles per experimental unit, corresponding to concentrations of 0, 0.07, 0.47, 0.67 and 1.60 items mL⁻¹, respectively. Assays were conducted in glass vial flasks containing 15 mL of artificial seawater, under the standardised culture conditions described in Section 2.3. The treatments evaluated are detailed in Table 1.

Table 1. Experimental design of static acute toxicity assays with nominal concentrations of copper (Cu) and microplastics (MPs), in triplicate, under different polymer conditions (pristine and photodegraded) and nominal concentrations, using the epibenthic model organism *Nitocra* sp. as a bioindicator. Exposure periods and tested concentrations for each treatment are presented. The endpoint used was 96-hour mortality in all assays. NA = not added.

Treatment	MPs (particles L ⁻¹)	Polymer Condition	Cu (mg.L ⁻¹)
Cu	NA	NA	0, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4
MPs	0, 7, 10 and 24	Pristine x Photodegraded	NA
MPs + Cu	5 and 10	Photodegraded	0.25 and 0.5
Plastisphere (1, 5, 10, 15 and 30 days)	5	Photodegraded	0.25

2.3.2. Isolated Copper

A copper stock solution at a nominal concentration of 10 mg.L⁻¹ was prepared by dissolving cupric chloride dihydrate (CuCl₂·2H₂O) (Dinâmica®) in ultrapure water adjusted to a salinity of 17, as described in Section 2.2.1. To ensure the stability of ions in solution, the stock solution was acidified with nitric acid (1%). Working solutions used in the assays were subsequently prepared by diluting the stock solution in artificial seawater at salinity 17, achieving the pre-established nominal concentrations for the forthcoming assays.

Exposure was carried out at increasing nominal concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg L⁻¹ (Ytreberg et al., 2010). Treatments are detailed in Table 1. This range was selected to encompass levels from sublethal to total mortality, enabling precise LC₅₀ calculation. Although exceeding baseline environmental levels, such concentrations are essential for establishing the sensitivity threshold of *Nitocra* sp. to the contaminant in isolation (Ytreberg et al., 2010). At the end of the 96 h exposure period, mortality was expressed as the LC₅₀. Initial (0 h) and final (96 h) samples were filtered, acidified (1% nitric acid) and analyzed via Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) (Poersch et al., 2026) to confirm nominal concentrations.

2.3.3. Combined Exposure: Microplastics and Copper

Following the protocol established in Section 2.3, combined exposure assays evaluated contaminant interactions. Treatments involved exposing 5 photodegraded PC microplastics (without plastisphere) to 0.25 mg L^{-1} Cu, and 10 particles to 0.5 mg L^{-1} Cu (Table 1). The 0.5 mg L^{-1} concentration was established based on preliminary acute assays with Cu alone, approximating the estimated 96 h LC_{50} . The 0.25 mg L^{-1} concentration was set at half this value to ensure a sublethal condition, preventing mass mortality of the organisms. This experimental strategy enabled a robust evaluation of potential synergistic, additive or antagonistic effects between Cu and microplastics, while minimizing interference from high mortality that could mask contaminant interactions.

2.3.4. Effect of the Plastisphere (Alone and in Combination with Copper)

Following each biological colonisation period (1, 5, 10, 15 and 30 days), 5 microplastic particles per replicate were used for toxicity assays. These assays aimed to determine the mortality of *Nitocra* sp. under the copper exposure conditions described in Section 2.3. Additionally, as outlined in Section 2.1.3.1, microplastics colonised at the different incubation time points were exposed to Cu solutions. The treatments evaluated are detailed in Table 1.

2.4. Preparation and Analytical Specification of Copper

For dissolved Cu determination, 10 mL water aliquots collected at 0 and 96 h were filtered ($0.45 \text{ }\mu\text{m}$ membrane), acidified (1% nitric acid), and refrigerated. Samples were analysed via Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) (HR-CS GF AAS, Analytik Jena, Jena, Germany). To minimize matrix effects from the experimental medium (salinity 17), samples were diluted 50-fold in ultrapure water containing 1% nitric acid (Suprapur®, Merck). Measurements were performed in triplicate with two injector washes between readings. Calibration used an analytical curve (0, 0.25, 1.25, 2.5, 3.75 and $5.0 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$); the method detection limit was $0.05 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Procedural blanks and reference standards were used throughout, with recovery consistently exceeding 90%.

2.5. Statistical Analysis

For all data analyses, the mean of the three quantitative readings from each treatment (triplicates) was used. Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test ($p = 0.05$). To detect significant differences in bacterial density and pigment assays, one-way and two-way ANOVA were applied, followed by Tukey's post hoc test ($p = 0.05$). Statistical analyses and graphical representations were conducted in the RStudio environment (v. 4.2.2). Processing of metabarcoding data consisted of organising taxonomic abundance spreadsheets and calculating the relative abundance of the principal microbial groups. These data were used as the basis for the construction of heatmaps, with the aim of identifying patterns of biological succession and community responses to copper exposure. Data manipulation (*metabarcoding*, bacterial density, chlorophyll-*a* and

toxicity) was performed using the *readxl*, *dplyr* and *tidyverse* packages, whilst graphical elements and heatmaps were standardised using the *ggplot2*, *scales*, *RColorBrewer*, *ggpubr*, *grid* and *ggtext* packages. In addition, a Generalised Linear Model (GLM) was applied specifically to *Nitocra* sp. mortality data (proportions), with the aim of characterising the relationship between the factors and the dependent variable. For this model, a quasibinomial distribution with a logit link function was employed to account for overdispersion, with analyses and post hoc multiple comparison tests performed using the *car*, *emmeans* and *multcomp* packages.

3. Results

3.1. Photodegradation of Microplastics and Plastisphere Characterisation

3.1.1. Surface Alterations

Scanning electron microscopy reveals morphological differences between pristine (Figure S1 1A–D) and photodegraded microplastics (Figure S1 2A–D). Pristine particles exhibit a smooth, homogeneous surface with well-defined contours and low porosity, containing only discrete irregularities from industrial manufacturing. In contrast, photodegraded microplastics display pronounced alterations, including increased roughness, microcracks, eroded regions, cavities, and interconnected pores, resulting in a complex, heterogeneous 3D topography.

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses (Figure S2) revealed structural modifications in polycarbonate (PC) microplastics. Compared to pristine (green), photodegraded (blue) particles exhibited a generalized increase in absorption intensity (Abs) while retaining the polymer's characteristic spectral signature. Band assignments and spectroscopic parameters are detailed in Table S1.

An increase was observed in the band at approximately $1,770\text{ cm}^{-1}$, corresponding to the stretching of the carbonyl group (C=O). This increase in carbonyl intensity is a classical indicator of PC photo-oxidation, suggesting the formation of new oxygenated groups on the microplastic surface. Additionally, the peak at $1,220\text{ cm}^{-1}$, associated with the asymmetric stretching of the C-O-C bond of the ester group, also exhibited greater absorbance in the degraded samples, corroborating the occurrence of molecular rearrangements resulting from exposure to UV radiation.

In the region of $1,500\text{ cm}^{-1}$ (C=C stretching of the aromatic ring) and near $2,970\text{ cm}^{-1}$ (C-H stretching), the bands remained preserved, albeit with greater amplitude in the photodegraded material. This pattern confirms that, although the base structure of the PC was maintained, photodegradation promoted significant surface chemical modification, rendering the microplastics more reactive towards subsequent biological colonisation and metal interaction.

3.1.2. Ecological Succession and Visual Colonisation

Visual analysis by SEM of the plastisphere formed on the microplastics revealed a progressive pattern of ecological succession throughout the experimental period (Figure 1). In the initial stages of exposure (Figure 1.1A–4A), incipient colonisation was observed, characterised by the heterogeneous presence of adhered diatoms and the formation of a discontinuous plastisphere on the microplastic surface.

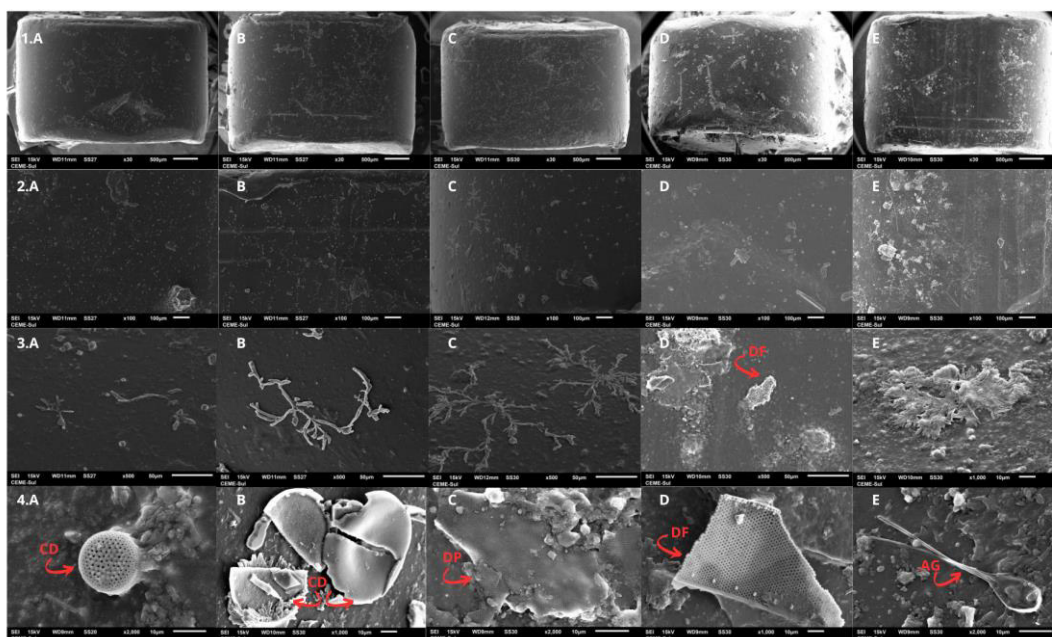


Figure 1. Micrographs obtained by Scanning Electron Microscopy illustrating the temporal evolution of plastisphere formation on microplastics. Rows represent magnifications of 30× (row 1), 100× (row 2) and 500× (row 3). Columns represent plastisphere formation time points: A (1 day), B (5 days), C (10 days), D (15 days) and E (30 days). Row 4 presents, at higher magnifications, details of the mature plastisphere (30 days), in which typical morphologies are indicated by letters and arrows: (CD) centric diatoms, (PD) pennate diatoms, (DF) diatom frustules and (AG) the diatom *Asterionellopsis glacialis*.

3.1.3. Bacterial Density

Bacterial density (Figure 2A) in the plastisphere varied significantly over time and between treatments ($p < 0.05$) (Table S6). In the plastisphere treatment, a progressive increase in density was observed, reaching $1,245 \pm 194$ cells cm^{-2} on day 1, and attaining stability on day 30 at $2,380 \pm 210$ cells cm^{-2} ($p > 0.05$). In the plastisphere combined with Cu treatment, bacterial density was significantly lower ($p < 0.05$) during the first ten days of exposure compared with the control, reaching its lowest value on day 10 at 505 ± 67 cells cm^{-2} . However, a marked recovery in colonisation was observed from day 15 onwards, culminating in significantly higher values on day 30 at $4,325 \pm 80$ cells cm^{-2} ($p < 0.05$) relative to the plastisphere alone treatment.

3.1.4. Photosynthetic Pigments

Chlorophyll-*a* concentrations (Figure 2B) exhibited distinct successional patterns between treatments (Table S7 (10.35, $p = 0.000$)). In the plastisphere treatment, concentrations did not differ significantly between day 1 (1.21 ± 0.30 $\mu\text{g cm}^{-2}$) and day

10 ($p > 0.05$), but increased markedly, reaching a peak on day 15 at $3.44 \pm 0.63 \mu\text{g cm}^{-2}$, and remaining elevated until the end of the experiment.

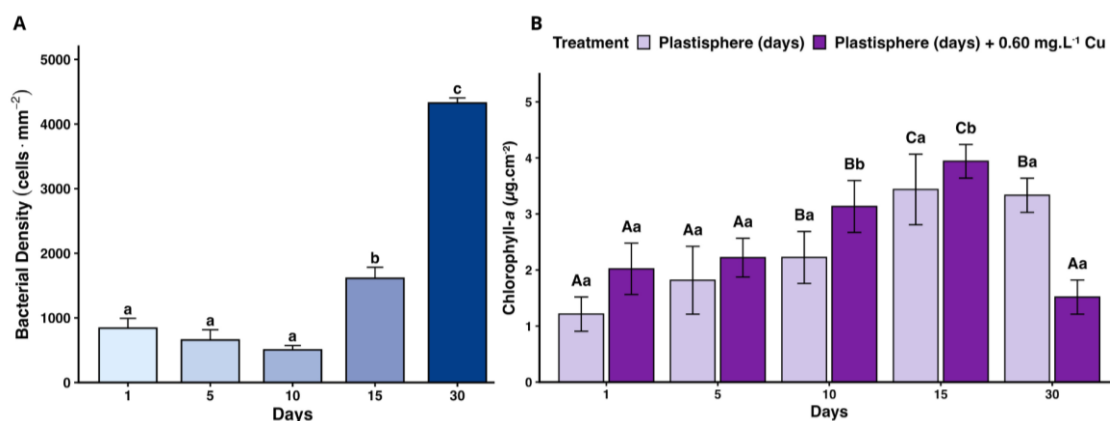


Figure 2. Biological characterisation of the plastisphere on microplastics used in toxicity assays: (A) bacterial density and (B) chlorophyll-*a* concentration. Data represent the mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Although presented together to characterise the exposure substrate, A and B refer to independent analyses conducted to identify the influence of plastisphere maturation on *Nitocra* sp. mortality. Temporal relationships were modelled using Generalised Linear Models (GLM), as assessed by one-way ANOVA (A) and two-way ANOVA (B), followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). Lowercase letters indicate differences between treatments at the same sampling time point, whilst uppercase letters indicate temporal variation within the same treatment.

In the experiment with the plastisphere combined with Cu, chlorophyll-*a* concentration was significantly higher on day 1 at $2.02 \pm 0.45 \mu\text{g cm}^{-2}$ compared with the control, and maintained increasing values until day 15, at which point its maximum value of $3.94 \pm 0.30 \mu\text{g cm}^{-2}$ was recorded. However, on day 30, a marked reduction in chlorophyll-*a* concentration was observed in the plastisphere with Cu treatment, to $1.52 \pm 0.30 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($p < 0.05$), with values significantly lower than those recorded in the plastisphere without metal. For both treatments, the concentration peak occurred on day 15; however, the effect of Cu resulted in severe inhibition of algal biomass at the end of the experimental period ($p < 0.05$). This decline indicates that the delayed toxicity of Cu compromised the viability of the photosynthetic community of the plastisphere after two weeks of exposure.

3.1.5. Plastisphere Community Composition

The surrounding water exhibited a diversified bacterial community (16S), characterised by the presence of genera such as *Actibacterium*, *Altererythrobacter* and *Bacillus* (Figure 3A). Within this matrix, 53 Operational Taxonomic Units (OTUs) were identified, with the most representative genera being *Bacillus*, *Croceibacter* and *Actibacterium*. Following the onset of exposure, a significant shift in plastisphere composition was observed. On day 1, a reduction in the relative abundance of the dominant water genera was recorded, with the emergence of *Albirhodobacter* and *Celeribacter*. Over time (days 15 and 30), the isolated plastisphere on PC was colonised predominantly by *Methylophaga*, *Rhodococcus* and *Sulfatobacter*, demonstrating a well-

defined succession with an increase in richness to 111 and 122 OTUs, respectively. In the Cu treatment, selectivity was even more pronounced: on day 1, a marked increase in *Actibacterium* (dominant red bar) was observed, a genus that had shown low representativeness in the water. At the final time points (day 30 Cu), the community was dominated by *Methylophaga* and *Sphingobium*, indicating that the metal favoured specific taxa that outcompeted the initial water colonisers.

Regarding fungi (ITS), which comprise a specialised fraction of the eukaryotes described previously, only 3 OTUs were identified in the inoculum (water), with absolute dominance of the genus *Aspergillus* (Figure 3C). However, this fungus exhibited low affinity for the PC surface, disappearing in the final stages of exposure. In the control treatment, day 1 was dominated by *Aspergillus* and *Cladosporium*, which were subsequently replaced by *Epicoccum* (grey bar) and *Coniella* (green bar) on day 30, totalling 9 OTUs at the end of the period. Under Cu stress, succession followed a distinct trajectory: on day 1, dominance of *Fusarium* (purple bar) and *Saccharomyces* was observed. Over the 15- and 30-day periods with the metal, *Sclerotinia* and *Cladosporium* were selectively enriched and persisted, exhibiting abundances considerably greater than those recorded in the water, demonstrating that the combination of plastic and metal inhibits fungal taxa common to the water column whilst favouring metal-tolerant genera.

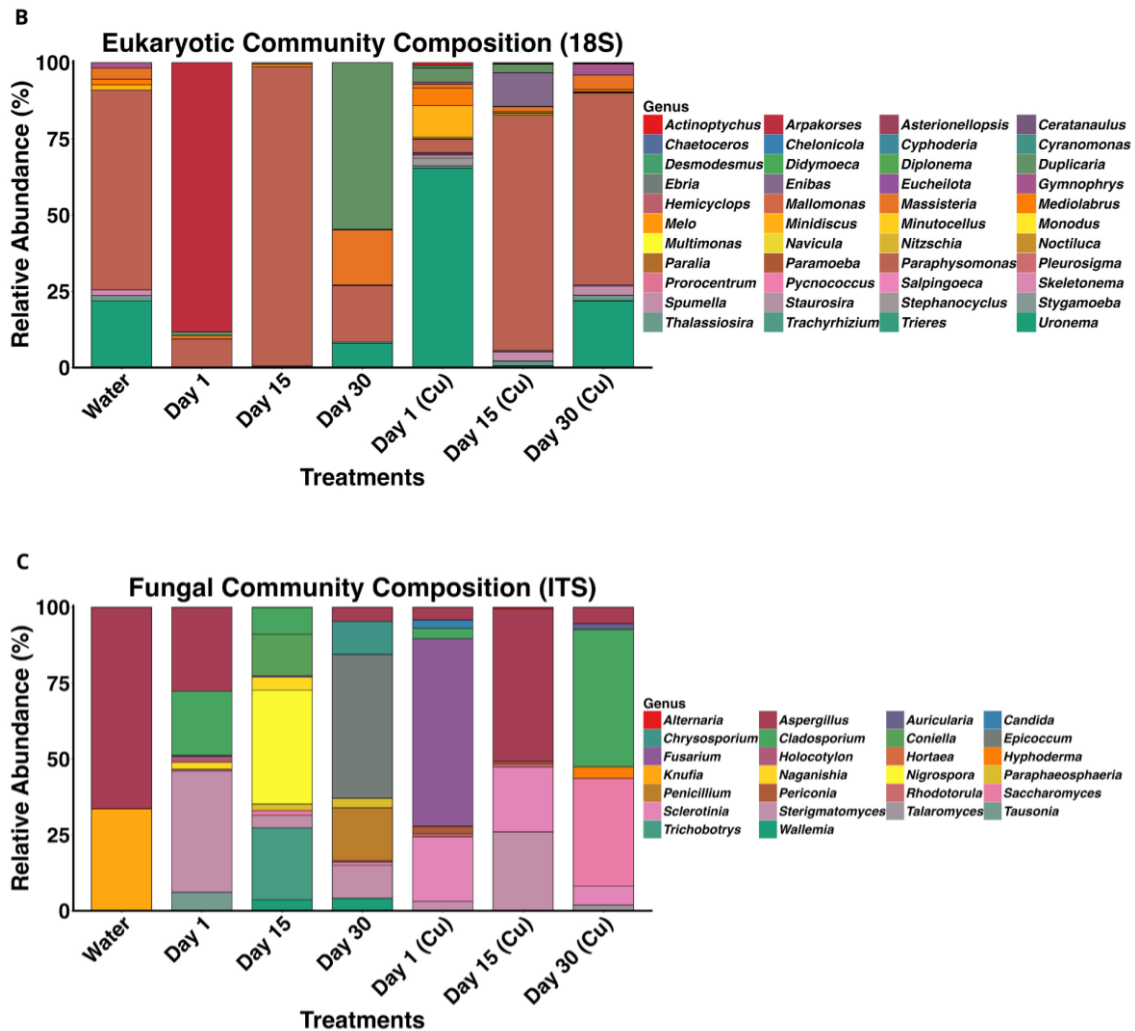


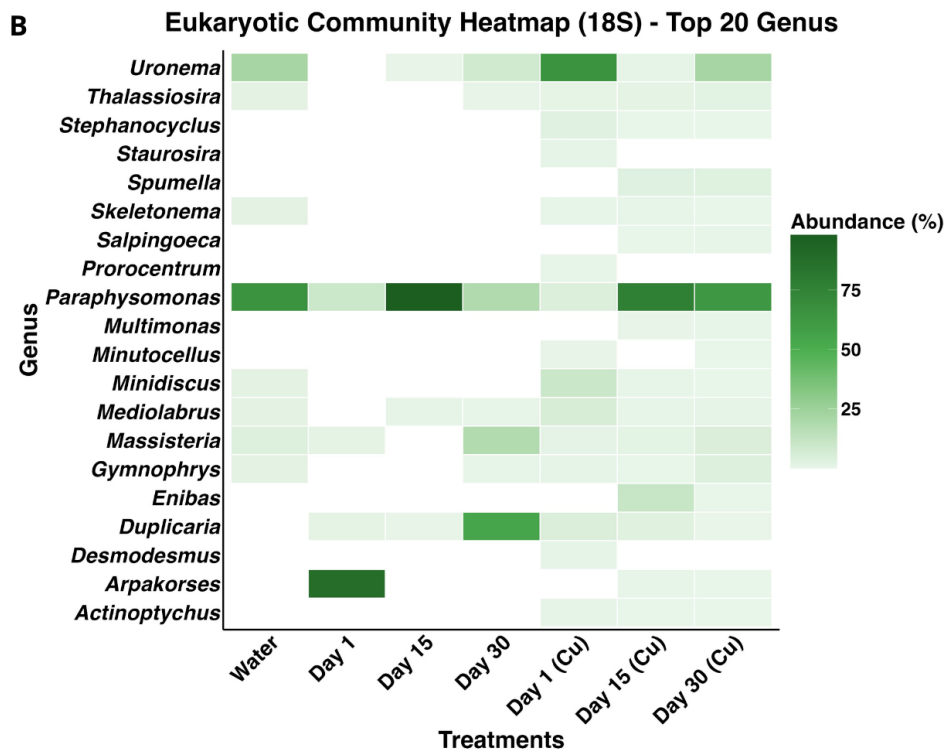
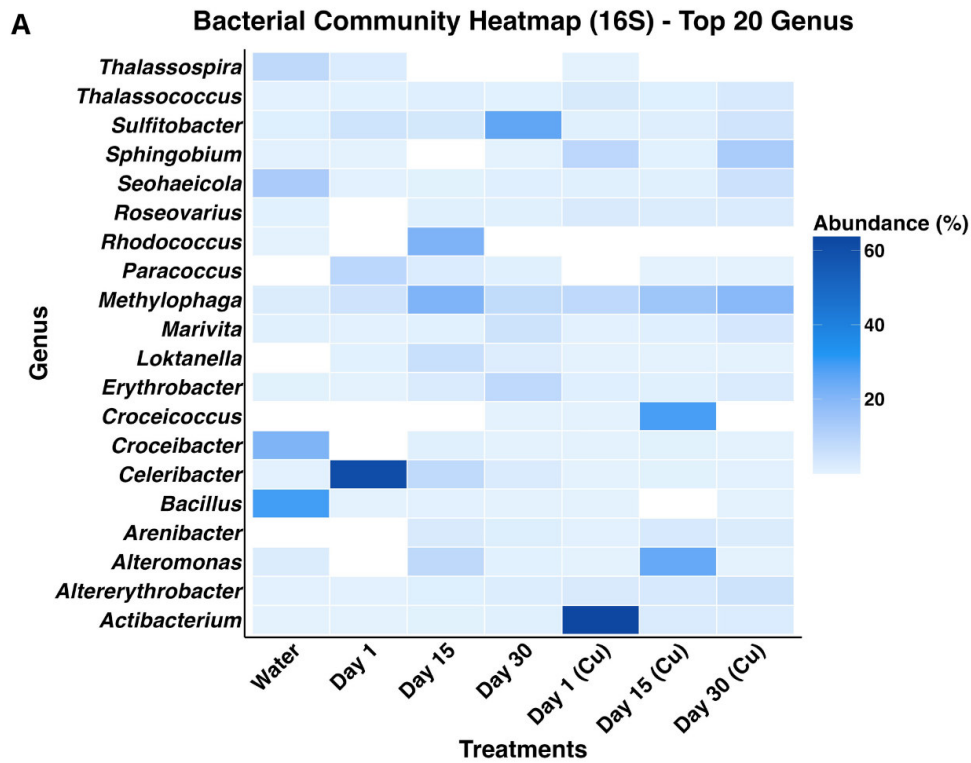
Figure 3. Relative abundance of plastisphere communities. Taxonomic composition at the genus level demonstrating variation in the percentage abundance of the most abundant genera: (A) Bacteria, (B) Eukaryotes and (C) Fungi. The value "S" represents the observed richness at each exposure time point and treatment.

The results of bacterial community (16S) succession and dynamics demonstrated a clear transition between the composition of the surrounding water and the plastisphere established on PC microplastics (Figure 4A). The successional dynamics of the plastisphere revealed distinct patterns of occurrence among the dominant taxa (Figure 4A). The genus *Actibacterium* exhibited a gradual exponential increase in its relative abundance in the control treatment over time. Under Cu stress, this taxon displayed immediate dominance at the initial stage of succession (day 1), followed by a progressive decline in its representativeness until the end of the experiment (day 30). In contrast, the genus *Seohaecicola*, although predominant in the inoculum (water), underwent a pronounced decline in its relative frequency from day 1 of exposure to the polymer. Its occurrence remained reduced throughout most of the succession in the control treatment, with an increase in representativeness observed only in the metal treatment at the end of the experimental period (day 30). In the initial stages (day 1), a progressive succession was observed in which *Celeribacter* dominated, being gradually replaced by

Methylophaga and *Sulfitobacter* in the mature stages (day 30). Under Cu stress, the dynamics highlighted an immediate resistance signature: the genus *Alteromonas* exhibited its greatest occurrence intensity on day 15 (Cu), whilst taxa such as *Sphingobium* and *Methylophaga* established themselves with high persistence only at the final time points of metal exposure.

Analysis of the 18S community revealed that the biological signature of the surrounding water, characterised predominantly by *Paraphysomonas* and *Uronema*, was almost entirely suppressed in the plastisphere (Figure 4B). It is worth noting that, although fungi and various groups of invertebrates appear in this general analysis, their dynamics are refined by the specific ITS marker. The invertebrate genus *Paraphysomonas* demonstrated a continuous colonisation capacity, with increasing intensity from day 1 to day 30. In the Cu treatment, succession revealed a niche shift: the ciliate *Uronema* and the genus *Duplicaria* exhibited exclusive occurrence peaks under metal stress, indicating that Cu not only alters abundance but also ensures the persistence of these invertebrates and opportunistic organisms throughout the entire experimental succession.

The fungal occurrence profile (ITS and 18S) revealed that the genus *Aspergillus*, despite its dominance in the surrounding water, did not maintain persistence on the plastic surface (Figure 4C). Succession indicated that the plastisphere was initially occupied by *Cladosporium* and *Candida*, which were subsequently replaced by *Epicoccum* and *Coniella* by day 30. In the presence of Cu, the dynamics diverged towards a high-tolerance profile: *Sterigmatomyces* and *Fusarium* exhibited strong initial occurrence, whilst the genus *Sclerotinia* established itself as the taxon with the greatest persistence in the final stages of contamination. This transition confirms that the fungal community associated with the ITS marker responds to the combination of polymer and metal through the exclusion of native species and the enrichment of an opportunistic assemblage.



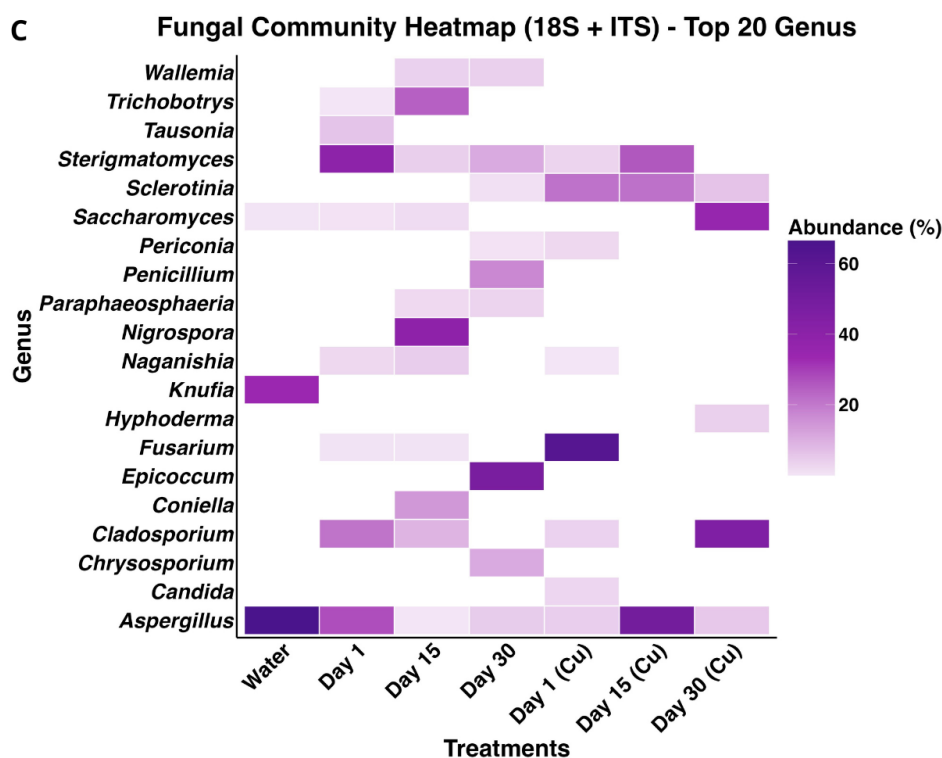


Figure 4. Community succession and dynamics. Heatmaps illustrating the variation in percentage abundance of the 20 most abundant genera for (A) Bacteria, (B) Eukaryotes and (C) Fungi throughout the experiment.

3.2. Acute Toxicity Assays (96 h)

3.2.1. Isolated Effect of Cu

Exposure of *Nitocra* sp. to Cu induced a progressive and significant increase in mortality after 96 h (Figure 5A). One-way ANOVA revealed a determining effect of concentration on organism survival (Table S8; $F = 345.8$, $p < 0.001$). Tukey's multiple comparison test demonstrated that the tested concentrations differed significantly from one another ($p < 0.05$), except for the two highest concentrations, which formed a group of total lethality.

At the treatment concentration of 0.12 mg L^{-1} , mean mortality was $16.7 \pm 2.36\%$, increasing to $33.3 \pm 3.2\%$ at 0.89 mg L^{-1} . A substantial increase in toxicity was observed at 1.48 mg L^{-1} , at which point mortality reached $76.7 \pm 5.0\%$. Total lethality ($100 \pm 0.1\%$) was achieved at concentrations of 2.71 and 5.16 mg L^{-1} , which did not differ significantly from one another by Tukey's test ($p > 0.05$), but differed significantly from all other treatments ($p < 0.001$). These results demonstrate a strong dose–response relationship for Cu alone, with an estimated median lethal concentration ($\text{LC}_{50-96 \text{ h}}$) of 0.56 mg L^{-1} .

3.2.2. Toxicity of Pristine versus Photodegraded Microplastics

Photodegraded microplastics induced greater mortality in *Nitocra* sp. compared

with pristine microplastics across the tested concentrations (Figure 5B). Two-way ANOVA revealed a significant effect of both microplastic type ($F = 13.83$, $p < 0.001$) and concentration ($F = 204.32$, $p < 0.001$) (Table S9), as well as their interaction ($F = 6.12$, $p = 0.022$), on organism mortality following 96 hours of exposure. $LC_{50-96\text{ h}}$ values were estimated at $17.64\text{ particles mL}^{-1}$ for pristine microplastics and $10.14\text{ particles mL}^{-1}$ for photodegraded microplastics, confirming the increase in toxicity following particle photodegradation.

Tukey's post hoc test indicated no significant mortality difference between pristine and photodegraded microplastics at 0 and 7 particles mL^{-1} ($p > 0.05$). Conversely, photodegradation enhanced toxicity at higher concentrations. Mortality was significantly higher for photodegraded particles at 10 particles mL^{-1} , a trend exacerbated at the maximum concentration of 24 particles mL^{-1} , where photodegraded microplastics exhibited the highest toxicity index (93.33% vs. 66.67%, $p < 0.05$).

3.2.3. Combined Exposure (Microplastics and Copper)

Isolated and combined exposure of microplastics and Cu induced a significant increase in the mortality of *Nitocra* sp. after 96 h. Analysis of variance revealed that both the presence of microplastics ($F = 8.59$, $p = 0.010$) and exposure to copper ($F = 5.78$, $p = 0.029$) exerted significant lethal effects (Table S10). Combined exposure revealed a clear dose-dependent response ($F = 68.11$, $p < 0.001$), whilst Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$) confirmed that the interaction between contaminants severely potentiated the deleterious effects on the microcrustacean (Figure 5C).

In the isolated treatments, the lowest mortality was observed at $0.37\text{ mg L}^{-1}\text{ Cu}$ ($16.67 \pm 2.92\%$), a group that shared statistical similarity with exposure to 5 microplastic particles ($26.67 \pm 3.46\%$). However, upon combining these dosages in the treatment of 5 particles + $0.36\text{ mg L}^{-1}\text{ Cu}$, mortality increased to $46.67 \pm 3.91\%$, a value significantly greater than that of the Cu alone control, albeit statistically similar to the $0.89\text{ mg L}^{-1}\text{ Cu}$ treatment ($36.67 \pm 3.77\%$).

The toxic effect was more pronounced at the highest concentrations. Whilst isolated exposure to 10 particles mL^{-1} of microplastics caused $60 \pm 3.84\%$ mortality, its combination with the metal (10 particles mL^{-1} + $0.67\text{ mg L}^{-1}\text{ Cu}$) resulted in total lethality of the organisms (100%). This treatment differed significantly from all other experimental groups ($p < 0.05$), suggesting an additive effect.

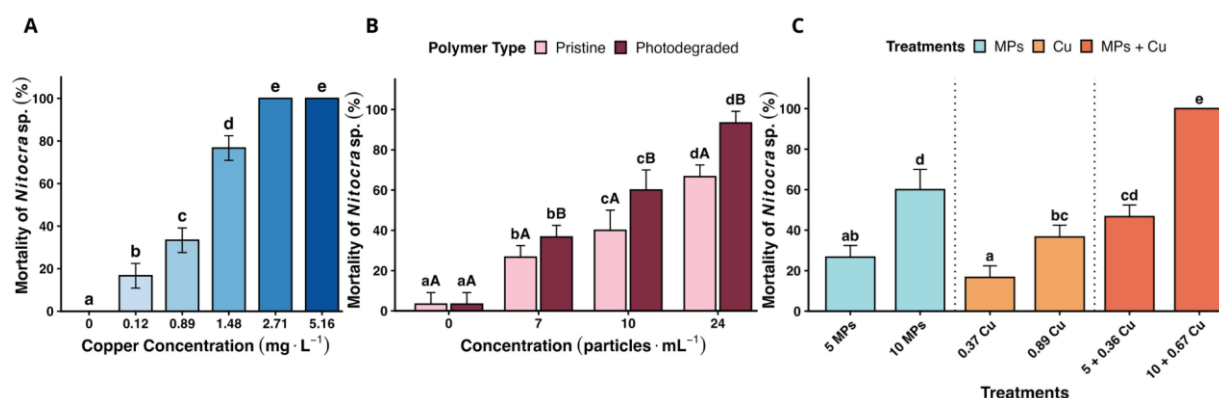


Figure 5. Mortality of *Nitocra* sp. (%) after 96 h of exposure. (A) Isolated Cu effect: actual measured concentrations (0, 0.12, 0.89, 1.48, 2.71, 5.16 mg L⁻¹) vs nominal (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg L⁻¹); blue bars represent initial measured values. (B) Effect of pristine and photodegraded microplastics (MPs) at different densities. (C) Combined effect: nominal 0.25 and 0.5 mg L⁻¹ Cu corresponded to measured 0.37 and 0.89 mg L⁻¹. Data: mean $\pm$ SD (n = 3). Lowercase letters denote significant differences ($p < 0.05$) between photodegradation conditions within concentrations (B); uppercase letters compare concentrations within conditions. Analysis: GLM with Tukey's post hoc test.

3.2.4. Influence of Plastisphere Maturation on Toxicity

Nitocra sp. mortality varied significantly among treatments (ANOVA, $p < 0.001$, Table S11), indicating that plastisphere maturation time is the primary factor influencing the biological response (Figure 6). During initial stages (days 1 to 10), mortality rates were lower and statistically similar, ranging from $6.67 \pm 2.39\%$ to $16.67 \pm 3.58\%$ for both isolated microplastics and the plastisphere combined with Cu (MP + Cu). The isolated metal control (0.60 mg L^{-1}) remained at the same level as these initial groups (16.67%). However, prolonged maturation promoted a progressive increase in polymer toxicity. On day 15, mortality reached comparable levels for isolated MP ($23.33 \pm 4.06\%$) and the plastisphere ($26.67 \pm 4.24\%$). The maximum lethal effect was recorded on day 30, where the plastisphere reached $36.67 \pm 4.62\%$ a significant increase relative to the experiment's start while remaining statistically equivalent to isolated microplastics from the same period ($26.67 \pm 4.24\%$).

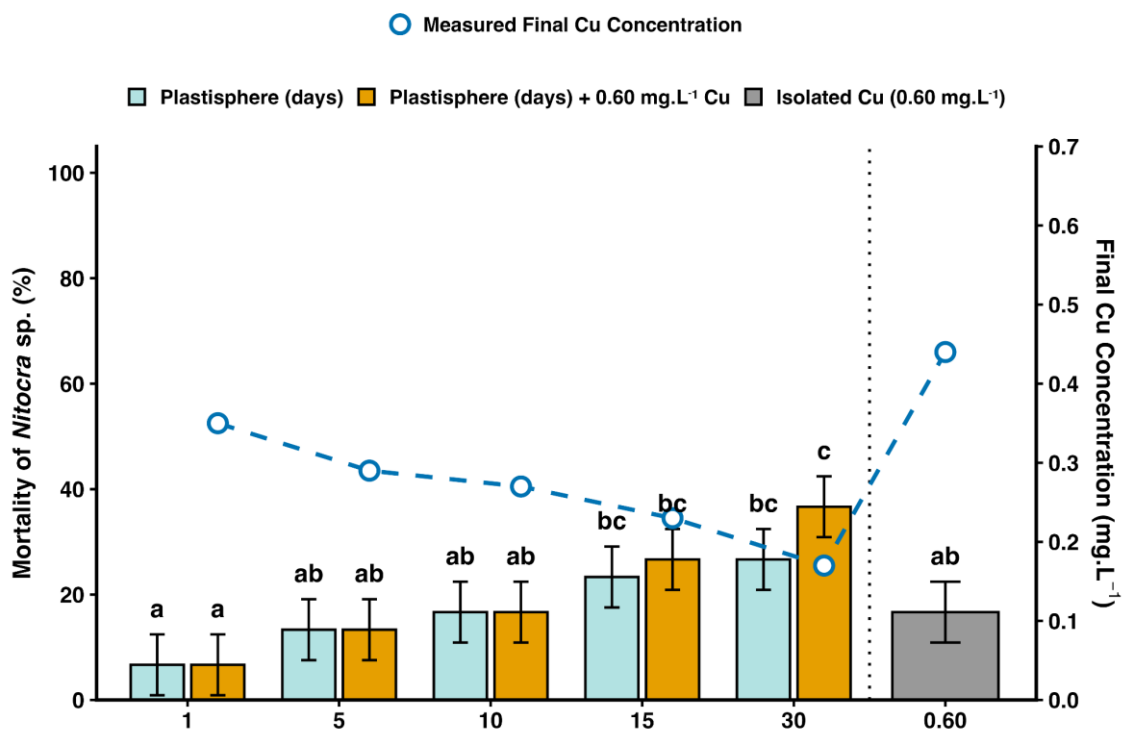


Figure 6. Data represent the mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$) of *Nitocra* sp. mortality after 96 h of exposure to experimental treatments. Green bars represent the plastisphere at different maturation time points (1, 5, 10, 15 and 30 days); orange bars represent combined exposure to the plastisphere at different maturation stages (1, 5, 10, 15 and 30 days) associated with Cu at an initial measured concentration of 0.60 mg L⁻¹ (nominal 0.25 mg L⁻¹); and the grey bar corresponds to isolated Cu exposure at 0.60 mg L⁻¹ (nominal 0.25 mg L⁻¹). The blue dashed line indicates the final measured copper concentration (mg L⁻¹) recorded in each treatment after the experimental period, as indicated on the secondary y-axis.

The measured copper concentration in the treatments exhibited a progressive decrease over the course of plastisphere succession. In the isolated copper treatment, the final measured concentration was 0.44 mg L⁻¹. In the combined treatments with the plastisphere, values decreased from 0.35 mg L⁻¹ (day 1) to 0.29 mg L⁻¹ (day 5), 0.27 mg L⁻¹ (day 10), 0.23 mg L⁻¹ (day 15) and, finally, 0.17 mg L⁻¹ after 30 days of maturation. The dose–response relationship was modelled using Generalised Linear Models (GLM). Distinct letters indicate significant statistical differences between treatments ($p < 0.05$), as assessed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.3. Analytical Validation of Copper Exposures

Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) analyses revealed that the detected Cu concentrations varied relative to the nominal values (Table S12). At the initial time point, the nominal doses of 1, 2 and 4 mg L⁻¹ yielded actual concentrations of 0.837 ± 0.48 mg L⁻¹, 2.71 ± 0.02 mg L⁻¹ and 5.16 ± 0.02 mg L⁻¹, respectively. In the control treatments (initial, final and plastisphere), Cu levels remained below the detection limit. At the end of the experiment, isolated Cu treatments exhibited values of 1.09 ± 0.003 mg L⁻¹ (nominal 1 mg L⁻¹), 2.18 ± 0.01 mg L⁻¹ (nominal 2 mg L⁻¹) and 3.83 ± 0.004 mg L⁻¹ (nominal 4 mg L⁻¹). In contrast, in the co-exposure treatments (MP + Cu), a

pronounced reduction in residual concentrations was observed with increasing microplastic density and plastisphere maturation. For the initial mixtures with 5 microplastic particles, the detected concentration was $0.362 \pm 0.0007 \text{ mg L}^{-1}$, decreasing to $0.232 \pm 0.00003 \text{ mg L}^{-1}$ at the end of exposure. In the treatments with matured plastisphere (MP + Cu, nominal 0.25 mg L^{-1}), final concentrations decreased from $0.352 \pm 0.002 \text{ mg L}^{-1}$ (day 1) to $0.173 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$ (day 30).

4. Discussion

4.1. Taxonomic and Genetic Validation of *Nitocra* sp.

The genetic identification of the studied microcrustacean represents a significant advance for Brazilian ecotoxicology. Historical reliance on the genus-level classification (*Nitocra* sp.) limits interlaboratory comparability, especially since many national cultures originate from collections made over 20 years ago. Using 'sp.' for a model organism is technically unsatisfactory, as congeneric species can exhibit distinct sensitivities to contaminants like Cu.

NCBI-BLASTn comparisons of orthologous sequences revealed low similarity between our sequence and global records, showing only 79.2% identity with *Ergasilus lizae* and 77.34% with *Nitocra yeelirrie*. Phylogenetic analyses (Figure S3) positioned the sequence as a sister terminal to *Nitocra lacustris* with only 75.97% similarity, confirming high intrageneric genetic divergence.

This high divergence and the lack of consistent monophyly reflect COI marker limitations for deep systematics in Ameiridae, but primarily expose the scarcity of South American harpacticoid sequences in international databases (Kearse et al., 2012). Nevertheless, generating this DNA barcode establishes an unprecedented reference baseline for the cultured lineage. This molecular identity allows future studies to monitor genetic drift across laboratories, ensuring that responses to microplastics and trace metals are traceable (Morales et al., 2025).

However, definitive elucidation requires further investigation. Future efforts combining complementary molecular markers and detailed ultrastructural morphology are essential to bridge this taxonomic gap, confirm a potential new species on the southern Brazilian coast, and ensure data precision for regional ecotoxicology.

4.2. Colonisation Dynamics and Ecological Succession in the Plastisphere

Metabarcoding analysis revealed that the polycarbonate (PC) plastisphere exhibits a dynamic ecological succession, with increasing microbial density and functional diversity at later stages (days 15 and 30). Copper (Cu) exposure acted as a determining selective pressure, modulating community composition in favor of metal-tolerant taxa. This taxonomic replacement aligns with environmental filtering theory in impacted marine ecosystems, where trace metals select for lineages with functional detoxification capacities, altering the plastisphere's metabolic profile (Coclet et al., 2021).

The compositional transition between the surrounding water and the plastisphere confirms that microplastics serve as a selective ecological niche rather than a passive substrate. The initial reduction of water-dominant genera (*Actibacterium* and *Glaciecola*) suggests physicochemical barriers that favor efficient pioneer colonizers like *Maribacter* and *Pseudoalteromonas*. By day 30, this primary succession yielded to a mature, complex plastisphere dominated by *Yamia* and *Lentibacter*, taxa specialized in degrading organic matter or colonization by-products (Ekanayaka et al., 2025).

Copper introduced a second, more stringent selective filter. The proliferation of *Alteromonas* on day 1 of Cu exposure indicates a classic stress response; both *Alteromonas* and *Vibrio* possess high metabolic plasticity and metal efflux mechanisms (Cesare et al., 2020). The ultimate dominance of *Thalassospira* and *Vibrio* suggests that Cu inhibits sensitive competitors and selects for a resistant chemotrophic community, permanently altering the successional trajectory (Naudet et al., 2025; Soto-Aguilera et al., 2021).

Eukaryotic analysis revealed the replacement of native water taxa (*Aspergillus*) by *Paraphysomonas* and *Uronema*, highlighting the role of protozoans as structural regulators in a trophic web where grazing controls bacterial populations. While polymer settlement provides greater nutrient access, it increases vulnerability to predation (Zettler et al., 2013). *Uronema*, a ciliate common in impacted environments, showed high affinity for Cu treatment, likely due to direct metal resistance (Mungunkhuyag et al., 2026) and the abundance of bacterial prey like *Alteromonas*. The higher richness on day 30 with Cu (S = 33) suggests a destabilization that allowed the coexistence of diverse opportunistic and tolerant invertebrates.

Conversely, the low affinity of *Aspergillus* reinforces substrate selectivity for fungi. Under Cu stress, common marine genera (e.g., *Cladosporium*) were replaced by *Nigrospora* and *Saccharomyces*. While fungi appear in the general 18S analysis, their dynamics are refined by the ITS marker. The persistence of *Saccharomyces* under contamination may relate to exopolysaccharide production aiding in metal biosorption, confirming that PC and Cu create an extreme environment requiring specific adhesion and detoxification capacities.

The exponential bacterial density increase from the second week onwards suggests that PC photodegradation favors a mature plastisphere. This 30-day succession demonstrates that exposure time is the primary driver of community structure surpassing initial polymer properties consistent with studies from the Lagoa dos Patos estuarine region (Sérvulo et al., 2023; Pinheiro et al., 2026).

Taxonomic data (Figure 4) reveal uneven growth. The PC Cu interface acted as a filter, favoring tolerant genera (*Uronema*, *Paraphysomonas*) over sensitive water column taxa (*Aspergillus*), reducing native diversity while favoring opportunistic organisms (Figure 5). Progressive dominance of Sphingomonadales and Alteromonadales under Cu stress suggests functional specialization. Alteromonadales and Sphingomonadales

possess TonB dependent transporters (TBDTs) specialized in transporting high molecular weight substrates and metal chelates (Zhao et al., 2024). This machinery provides a competitive advantage in Cu saturated, nutrient scarce niches (Coclet et al., 2021).

Parallel successional patterns in Eukarya reinforce plastisphere stability. The final dominance of the ascomycete *Epicoccum sorghinum* underscores its physiological robustness and metal biosorption capacity (Li et al., 2023), while the persistence of autotrophic Chromulinales suggests undisturbed primary productivity and carbon cycling. Together, these results corroborate marine microcosm models identifying stable, versatile plastispheres as an adaptive response to microplastics and inorganic pollutants (Amaral-Zettler et al., 2020; Garcia and Procópio, 2020; Lamim and Procópio, 2021).

4.3. Toxicity to *Nitocra* sp.

4.3.1. Isolated Metal

Copper (Cu) toxicity to *Nitocra* sp. manifested in a dose-dependent manner, with progressive mortality over the 96-hour exposure period. This pattern is characteristic of trace metals in microcrustaceans, where copper induces potent oxidative stress and cellular damage (Cruz et al., 2014; Lear et al., 2023). While lower concentrations caused reduced lethality, a total mortality threshold at the highest dosages (above 2.71 mg L⁻¹) defined the copepod's biological tolerance limit to the free ionic metal (Perina and Abessa, 2020).

The calculated 96h-LC₅₀ of 0.565 mg L⁻¹ establishes the toxicity threshold under standardized conditions, validating the sensitivity of the organism batch. Characterizing the isolated metal's toxicity provides a robust comparative baseline, allowing subsequent experimental stages to distinguish the direct effect of the soluble metal cation from more complex interactions within the system.

4.3.2. Influence of MP Photodegradation

The greater lethality observed with photodegraded polycarbonate (PC) correlates directly with the polymer's increased topographical complexity and chemical reactivity. While the pristine material presents a smooth, low-porosity surface, the microcracks, erosion, and pores identified via SEM (Figure S1) demonstrate that abiotic photodegradation creates high surface roughness. This photo-oxidation process induces polymer chain scission and increases surface crystallinity, resulting in an embrittled material (Redjala et al., 2020). These deep cavities significantly expand the surface area available for plastisphere attachment and metal entrapment.

Chemically, PC oxidation, confirmed by increased FTIR absorption bands for the carbonyl (1770 cm⁻¹) and ester (1220 cm⁻¹) groups (Figure S2), indicates that UV radiation generates new oxygenated functional groups. This severe oxidation permanently alters the surface energy of PC, reducing its hydrophobicity (Redjala et al., 2020).

Specifically, the increase in carbonyl (C=O) groups enhances chemical affinity for metal cations, acting as active binding sites for copper.

Thus, morphological and chemical alterations act in concert: surface roughness provides physical support and protected microenvironments, while oxygenated functional groups confer the reactivity required for metal adsorption. This dual mechanism validates aged microplastics as efficient contaminant vectors, making the associated copper bioavailable to *Nitocra* sp. via contact or ingestion, and justifying the observed reduction in LC₅₀.

4.3.3. Influence of the Plastisphere on the Toxicity of MPs Alone and in Combination with Copper (Cu)

The plastisphere significantly altered the microplastics ecotoxicological profile, with community maturation representing the primary driver of lethality in *Nitocra* sp. Co-exposure to photodegraded microplastics and copper revealed a clear dose-dependent response (Figure 5C). While isolated exposure caused partial mortality, combining both stressors resulted in total lethality, confirming an additive effect where the polymer acts as an additional vector.

This toxicity increment is directly linked to maturation time (Figure 6). During initial stages (days 1-10), mortality rates were low and statistically similar between isolated and co-exposure treatments, resembling the isolated metal control. However, by day 30, mortality reached its maximum threshold. Notably, at later stages (days 15 and 30), the addition of copper did not further increase toxicity; isolated and combined plastisphere exposures demonstrated statistical equivalence, indicating that mature plastisphere complexity becomes the dominant biological factor (Figure S5).

This dynamic is associated with the plastic's transition into a dynamic microhabitat (Amaral-Zettler et al., 2020). The expansion of taxonomic diversity and the extracellular polymeric substance (EPS) matrix modifies contaminant bioavailability (Dey et al., 2022; Chen et al., 2025). Chemical analyses corroborate this, revealing that the plastisphere acted as a metal sink; dissolved copper decreased progressively from 0.44 mg L⁻¹ to 0.17 mg L⁻¹ over 30 days due to the high affinity of EPS for metal cations (Richard et al., 2019).

Because the lowest dissolved metal levels coincide with the highest mortality, a shift in the exposure pathway is indicated, suggesting that copper concentrated within the organic matrix becomes bioavailable via ingestion or direct contact. This discrepancy, measured via Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) (Table S11), highlights the need to monitor actual concentrations (Richard et al., 2019; Djaoudi et al., 2022). Copper also acts as a selective pressure, reducing sensitive microorganism diversity while favoring tolerant taxa (Lear et al., 2023). Minor nominal-to-measured discrepancies stem from analytical uncertainties inherent to handling reduced volumes, without compromising adsorption interpretation.

5. Conclusion

This study demonstrates that the toxicity of polycarbonate (PC) to *Nitocra* sp. is additively modulated by abiotic aging and biological succession. Photodegradation triggers reactivity, as increased surface roughness and oxidation (C=O groups) elevate the polymer's toxic potential. Plastisphere maturation over 30 days is a determining factor in lethal severity, suggesting that mature biofilms alter exposure interfaces and the bioavailability of associated contaminants. The selection of copper-tolerant taxa and reduction in algal biomass reinforce that the interaction between degraded particles and trace metals potentiates mortality more severely than isolated stressors. In summary, the association between aged microplastics, ecological succession, and trace metals constitutes an underestimated threat to estuarine ecosystem integrity.

6. CRediT authorship contribution statement

Luana Peçanha: Writing – original draft, writing – review and editing, data curation, laboratory work, conceptualisation. **Mikael Morales:** Writing – review and editing, data curation, laboratory work, resources, conceptualisation. **Vanessa Agostini:** Writing – review and editing, data curation, conceptualisation. **Camila Martins:** Data curation, laboratory work, resources, writing – review and editing. **Maximiliano Maronna:** Writing, data curation, laboratory work, resources. **Sanye Soroldoni:** Writing – review and editing, data curation, laboratory work, resources, conceptualisation. **Grasiela Pinho:** Writing – review and editing, resources, conceptualisation.

7. Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this article.

8. Acknowledgements

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. The authors wish to thank the Laboratory of Organic Microcontaminants and Aquatic Ecotoxicology (CONECO) for institutional support and laboratory resources. The authors would like to thank the Centro Integrado de Análises - CIA-FURG (funded by Finep-CT-INFRA, CAPES-Pró-Equipamentos, and MCTI-CNPq-SisNano2.0) for the analysis performed.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - (CAPES) through a Master's scholarship awarded to L.P.S. (Process No. 88887.991485/2024-00). This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (406391/2021-1 and 409084/2023-

9). M.L.P.M. thanks CAPES for the provided postdoctoral association (Process 88887.111386/2025-00). C.M.G.M. is a research fellow PQ 312480/2023-7 of CNPq. G.L.L.P is a research fellow PQ 307700/2022-4 of CNPq.

9. Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found online at:

10. Data availability

Data will be made available upon reasonable request.

11. References

Agostini, V.O., Terres Rodrigues, L., Macedo, A.J., Muxagata, E., 2021. Comparison of techniques for counting prokaryotes in marine planktonic and biofilm samples. *Sci. Mar.* 85 (3), 211–220. <https://doi.org/10.3989/scimar.05117.019>.

Amaral-Zettler, L.A., Zettler, E.R., Mincer, T.J., 2020. Ecology of the plastsphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 139–151. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0308-0>.

Andrady, A.L., Barnes, P.W., Bornman, J.F., Gouin, T., Madronich, S., White, C.C., Zepp, R.G., Jansen, M.A.K., 2022. Oxidation and fragmentation of plastics in a changing environment; from UV radiation to biological degradation. *Sci. Total Environ.* 851, 158022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158022>.

Atlas do Plástico, 2020. Atlas do plástico: fatos e números sobre o mundo dos polímeros sintéticos. Rio de Janeiro, Brasil.

Cesare, A., Petra, P., Ester, M.E., Neven, C., Maritina, M.Š., Gianluca, C., 2020. The role of metal contamination in shaping microbial communities in heavily polluted marine sediments. *Environ. Pollut.* 265, 114823. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114823>.

Chen, H., Wang, X., Yin, H., Sun, L., Yang, X., Zhong, W., 2025. Microplastic surface biofilms: a review of structural assembly, influencing factors, and ecotoxicity. *Front. Mar. Sci.* 12, 1701766. <https://doi.org/10.3389/fmars.2025.1701766>.

Coclet, C., Garnier, C., D’Onofrio, S., Durrieu, G., Pasero, E., Le Poupon, C., 2021. Trace metal contamination impacts predicted functions more than structure of marine prokaryotic biofilm communities in an anthropized coastal area. *Front. Microbiol.* 12, 292. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630412>.

Cruz, A.C.F., Davanzo, M.B., Araujo, G.S., Buruaem, L.M., Santaella, S.T., Morais, R.D., Abessa, D.M.S., 2014. Cumulative influences of a small city and former mining

activities on the sediment quality of a subtropical estuarine protected area. *Environ. Monit. Assess.* 186 (11), 7035–7046. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3908-z>.

Dey, T., Trasande, L., Altman, R., 2022. Global plastic treaty should address chemicals. *Science* 378 (6622), 841–842. <https://doi.org/10.1126/science.adf5410>.

Djaoudi, K., Tesan Onrubia, J.A., Boukra, A., Guesnay, L., Portas, A., Barry-Martinet, R., Angeletti, B., Mounier, S., Lenoble, V., Briand, J.F., 2022. Seawater copper content controls biofilm bioaccumulation and microbial community on microplastics. *Sci. Total Environ.* 814, 152278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152278>.

Ekanayaka, A.H., De Silva, N.T., Tarafder, E., Chen, X.M., Dai, D.Q., Stephenson, S.L., Asad, S., Tibpromma, S., Karunarathana, S.C., 2025. Linking the metabolic activity of plastic degrading fungi to their taxonomy and evolution. *J. Fungi* 11 (5), 378. <https://doi.org/10.3390/jof11050378>.

Flemming, H.C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.

Garcia, M., Procópio, L., 2020. Distinct Profiles in Microbial Diversity on Carbon Steel and Different Welds in Simulated Marine Microcosm. *Curr. Microbiol.* 77, 967–978. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01898-4>.

Hanvey, J.S., Lewis, P.J., Lavers, J.L., Crosbie, N.D., Pozo, K., Clarke, B.O., 2017. A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments. *Anal. Methods* 9, 1369–1383. <https://doi.org/10.1039/C6AY02707E>.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

Lamim, V.B., Procópio, L., 2021. Influence of acidification and warming of seawater on biofouling by bacteria grown over API 5L steel. *Indian J. Microbiol.* 61 (2), 151–159. <https://doi.org/10.1007/s12088-021-00925-7>.

Lear, R., Metcalf, B., Brailey, G., Nunns, M., Bond, B., Hillsdon, M., 2023. Associations of habitual physical activity and carotid femoral pulse wave velocity; a systematic review and meta analysis of observational studies. *PLoS One* 18 (4), e0284164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284164>.

Li, J., Xu, J., Wang, H., Wu, C., Zheng, J., Zhang, C., Han, Y., 2023. First report of fungal pathogens causing leaf spot on sorghum sudangrass hybrids and their interactions with plants. *Plants* 12 (17), 3091. <https://doi.org/10.3390/plants12173091>.

- Li, W., Chen, P.J., 2025. Integrating bioavailability and toxicity of copper in estuarine sediments using whole sediment exposure with medaka embryos. *Sci. Total Environ.* 1001, 180514. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.180514>.
- Lopes, T.O.M., Silveira, C.R.D., Araujo da Silva, J., Guedes, T., Tavella, R.A., Rola, R.C., Marques, J.A., Vieira, C.E.D., Bianchini, A., Martins, C.M.G., 2025. A six year ecotoxicological assessment of the Doce river and coastal marine areas impacted by the Fundão tailings dam failure, Brazil. *Environ. Pollut.* 371, 125897. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.125897>.
- Lotufo, G.R., Abessa, D.M.S., 2002. Toxicity tests with whole sediment and estuarine interstitial water using benthic copepods. In: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M., Nipper, M.G. (Eds.), *Methods in marine ecotoxicology: applications in Brazil*. Artes Graficas, Sao Paulo, pp. 151–162.
- Melzi, A., Zecchin, S., Colombo, M., Borgonovo, G., Mazzini, S., Mondal, S., Arioli, S., Cavalca, L., 2026. Copper biosorption by *Serratia plymuthica*: crucial role of tightly bound extracellular polymeric substances in planktonic and biofilm systems. *Biodegradation* 37 (1), 25. <https://doi.org/10.1007/s10532-026-10245-6>.
- Morales, M.L.P., das Neves, L.O., Shaik, A., Chenia, H., Maronna, M.M., Soroldoni, S., Nagata, R.M., They, N.H., Agostini, V.O., Pinho, G.L.L., 2025. *Cabomba caroliniana* and *Schoenoplectus californicus* as Antifouling Candidates: Anti Attachment and Toxicological Effects in *Aurelia coerulea* (Cnidaria, Scyphozoa). *Environ. Toxicol.* 1 17. <https://doi.org/10.1002/tox.24579>.
- Mungunkhuyag, K., Steingroewer, J., Walther, T., 2026. Isolation and characterization of heavy metal tolerant microalgae from old mining areas of Saxony. *Sci. Rep.* 16, 1337. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-32393-0>.
- Naudet, J., Roque d'Orbecastel, E., Bouvier, T., Auguet, J.C., 2025. Plastic associated pathogens in marine environments: a meta analysis. *Mar. Pollut. Bull.* 219, 118266. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.118266>.
- Oberbeckmann, S., Osborn, A.M., Duhaime, M.B., 2016. Microbes on a Bottle: Substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris. *PLoS One* 11 (8), e0159289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159289>.
- Oleinski, B., Carneiro, T., das Neves, L.O., Morales, M.L.P., Albertoni, E.F., 2026. Preference by the nymphs of *Americabaetis alphas* Lugo Ortiz and McCafferty, 1996 (Baetidae: Ephemeroptera) for feeding substrate and food size under laboratory conditions. *Neotrop. Entomol.* 55, 15. <https://doi.org/10.1007/s13744-026-01361-2>.

- Perina, F.C., Abessa, D.M.S., 2020. Contamination and toxicity in a subtropical Estuarine Protected Area influenced by former mining activities. *Ocean Coast. Res.* 68, e20313. <https://doi.org/10.1590/S2675-28242020068313>.
- Pinheiro, L.M., Andreola, L.T., Mendes, C.R.B., Morales, M.L.P., Agostini, V.O., Pinho, G.L.L., 2026. Salt marsh zonation and substrate type modulation for plastisphere: an experimental assessment in the Lagoon Patos estuary in extreme south of Brazil. *Arch. Microbiol.* 208, 232. <https://doi.org/10.1007/s00203-026-04759-z>.
- Poersch, S.L., Soroldoni, S., Lopes, F.C., Martins, C.M.G., Grassi, M.T., Silva, B.J., Camargo, M.G., Kerr, R., Pinho, G.L.L., 2026. Copper Dynamics in the Aquatic Environment Under Ocean Acidification and Contamination by Microplastics. *Water Air Soil Pollut.* 237, 771. <https://doi.org/10.1007/s11270-026-09440-1>.
- Ramsperger, A.F.R.M., Stellwag, A.C., Caspari, A., Fery, A., Lueders, T., Kress, H., Löder, M.G.J., Laforsch, C., 2020. Structural diversity in early stage biofilm formation on microplastics depends on environmental medium and polymer properties. *Water* 12, 3216. <https://doi.org/10.3390/w12113216>.
- Redjala, S., Aït Hocine, N., Ferhoum, R., Gratton, M., Poirot, N., Azem, S., 2020. UV Aging Effects on Polycarbonate Properties. *J. Fail. Anal. Prev.* 20 (6), 1907–1916. <https://doi.org/10.1007/s11668-020-01002-9>.
- Richard, H., Carpenter, E.J., Komada, T., Palmer, P.T., Rochman, C.M., 2019. Biofilm facilitates metal accumulation onto microplastics in estuarine waters. *Sci. Total Environ.* 683, 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.331>.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmolle, M., Stewart, P.S., Bjarnsholt, T., 2022. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
- Schmidt, P.A., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J., Schmitt, I., 2013. Illumina *metabarcoding* of a soil fungal community. *Soil Biol. Biochem.* 65, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.014>.
- Seewoo, B.J., Wong, E.V.S., Mulders, Y.R., Goodes, L.M., Eroglu, E., Brunner, M., 2024. Impacts associated with the plastic polymers polycarbonate, polystyrene, polyvinyl chloride, and polybutadiene across their life cycle: A review. *Heliyon* 10 (12), e32912. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32912>.
- Sérvulo, T., Taylor, J.D., Proietti, M.C., Rodrigues, L.S., Puertas, I.P., Barutot, R.A., Lacerda, A.L.F., 2023. Plastisphere composition in a subtropical estuary: Influence of season, incubation time and polymer type on plastic biofouling. *Environ. Pollut.* 332, 121873. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121873>.

Silva, L.F., Soroldoni, S., Kessler, F., Fernandes, A.N., Pinho, G.L., 2023. Influence of UV exposure time and simulated marine environment on different microplastic degradation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30, 121450–121464. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-30925-7>.

Soto-Aguilera, S., Modak, B., Aldabaldetrecu, M., Lozano, C.P., Guerrero, J., Lefimil, C., Parra, M., 2021. In Vitro Effect of Copper (I) Complex Cu(NN1)2 on *Vibrio harveyi* BB170 Biofilm Formation. *Microorganisms* 9, 2273. <https://doi.org/10.3990/microorganisms9112273>.

Starke, R., Kermer, R., Ullmann-Zeunert, L., Baldwin, I.T., Seifert, C.L., Bastida, F., von Bergen, M., Vogt, C., 2016. Bacteria dominate the short term assimilation of plant derived N in soil. *Soil Biol. Biochem.* 97, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.016>.

Wang, Y., Qian, P.Y., 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One* 4 (10), e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>.

Ytreberg, E., Karlsson, J., Eklund, B., 2010. Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater. *Sci. Total Environ.* 408 (12), 2459–2466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.036>.

Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146. <https://doi.org/10.1021/es401288x>.

Zhao, Z., Amano, C., Reinthaler, T., Orellana, M.V., Herndl, G.J., 2024. Substrate uptake patterns shape niche separation in marine prokaryotic microbiome. *Sci. Adv.* 10 (20), eadn5143. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adn5143>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

From Pristine to Biofouled: Microplastic Aging and Plastisphere Succession Shape Copper Toxicity in the Epibenthic Copepod *Nitocra* sp. (Boeck, 1865)

Luana Peçanha dos Santos^{a,b,*}; Mikael Luiz Pereira Morales^{a,b,c}; Vanessa Ochi Agostini^{b,f}; Camila De Martinez Gaspar Martins^d; Maximiliano Manuel Maronna^c; Sanye Soroldoni^{a,b}; Grasiela Lopes Leães Pinho^{a,b}.

^a Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática, Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Av. Itália, Km 8, Carreiros, CEP: 96203-900 - Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

^b Programa de Pós-graduação em Oceanologia (PPGO), Instituto de Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

^c Programa de Pós-graduação em Oceanologia Biológica (PPGOB), Instituto de Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

^d Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

^e Programa Institucional de Pós-Doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PIPD-CAPES/PPGO).

^f Regenera Moléculas do Mar, Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 96D - Sala 210 - Partenon, Porto Alegre - RS, 90160-091.

Genetic Identification of *Nitocra* sp.

Designation at the genus level only (*Nitocra* sp.) is a common practice in several national laboratories, which frequently includes cultures originating from historical collections made more than two decades ago. This occurs mainly due to the lack of specialists in morphological taxonomy, in our case, related to harpacticoid copepods. Based on the widespread use of *Nitocra* sp. as a model organism in ecotoxicological assays in Brazil, the genetic identification of the cultivated strain was carried out.

In order to increase taxonomic accuracy and ensure the reproducibility of sensitivity data for this model organism in ecotoxicological assays in Brazil, sequencing of the mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene was performed. This molecular approach aims to fill the gap left by the difficulty of morphologically distinguishing between closely related species, ensuring that the biological responses observed in this study are attributed to a genetically characterized lineage, thus conferring greater scientific robustness to the status of the culture model species used.

Specific genetic methodology

Total DNA removal was performed based on a saline negotiation protocol. A pool of individuals from the culture was manually homogenized in 2 mL tubes containing lysis supplemented with RNase and proteinase K. Genomic DNA was separated from other cellular components by feeding with 5 M NaCl, followed by two washing steps with absolute isopropanol and 70% ethanol. The precipitated DNA was resuspended in selective TE, and its concentration was determined by spectrophotometry (NanoDrop), resulting in $38 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ in a final volume of 20 μL , a value considered adequate for PCR responses.

Mitochondrial COI gene amplification was performed using two alternative primer sets: universal primers for Metazoa, LCO1490 and HCO2198, and specific primers for Copepoda, LCO1490_MOD_COP and HCO2198_MOD_COP_3. PCR reactions were conducted in a final volume of 25 μL , containing FastPol HF DNA Polymerase (Cellco), 5 $\times$ occurrences, primers, DNA template, and ultrapure water. The amplification protocol consists of initial denaturation at 98 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 98 °C for 20 s, annealing at 50 °C for 30 s, extension at 72 °C for 30 s, and a final extension at 72 °C for 7 min.

The amplified products were selected by electrophoresis on a 1.5% agarose gel, stained with GelRed, and subsequently purified with a magnetic particle-based kit (Agencourt AMPure XP). Sequencing responses were performed on both strands using the BigDye Terminator kit, with the same primers used in the PCR. Sequencing was conducted on an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Hitachi). The resulting chromatograms were run and edited, resulting in a 624 base pair consensus sequence, verified in Geneious v9.1.8 software. Finally, the consensus sequences were compared with data available in GenBank for species identification within the genus *Nitocra*. The sequences generated in this project were deposited in the National Center for Biotechnology Information GenBank database.

Control Chart

To monitor the health of the culture, sensitivity tests were performed monthly with the reference substance Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Soroldoni et al., 2017). The tests were performed using the methodology of Lotufo and Abessa (2002), which consists of exposing adult *Nitocra* sp. individuals to a static test substance for 96 h, with a 12h:12h photoperiod, a temperature of 25°C, without aeration or feeding. For this, ten adult organisms were selected, excluding ovigerous females, using increasing nominal concentrations of SDS of 4, 6, 8, 10, and 12 mg.L⁻¹ to obtain the median lethal concentration (LC50-96h), determined from the mortality observed in 50% of the organisms exposed over 96 hours. The assay was performed in triplicate for each treatment.

Results

Sensitivity and Cultivation of Test Organisms

The maintenance of *Nitocra* sp. cultures was carried out under controlled laboratory conditions, following standardized cultivation and feeding protocols. The health and sensitivity of the organisms were monitored monthly through reference toxicity tests using sodium dodecyl sulfate (SDS). The results of the control chart, which confirm the stability and viability of the organisms for ecotoxicological assays, as well as the methodological details of the maintenance, are presented in the Supplementary Material (Tables S1 and S2 and Figure S4).

Genetic Identification of *Nitocra* sp.

Initial taxonomic identification revealed low similarity of the sequence obtained in this study with available records for Copepoda. The highest similarity observed was 79.2% with *Ergasilus lizae* (GenBank PP239047, family Ergasilidae), while direct comparison with species of the genus *Nitocra* indicated a maximum similarity of 77.34% with *Nitocra yeelirrie* (GenBank KM409716.1). These values demonstrate high genetic divergence, even in intrageneric comparisons.

Additional phylogenetic analyses, based on the mitochondrial COI gene, were conducted using sequences available in GenBank, considering two independent datasets: (i) species of the family Ameiridae and (ii) species of the genus *Nitocra*. The sequences were aligned using the MAFFT algorithm (E-INS-i option), and phylogenetic inferences were performed using the FastTree program, with uncorrected pairwise genetic distance estimates. The results of these analyses are presented in the Supplementary Material (Figure S3). Phylogenetic reconstructions indicated limitations of the COI marker for phylogenetic resolution at the family level, since several genera, including *Nitocra*, did not form consistent monophyletic groups. In both analyses, the sequence obtained in this study was positioned as a terminal sister to *Nitocra lacustris*, showing a genetic similarity of 75.97%. Overall, high levels of genetic divergence were observed both between species of the same genus (approximately 70–75%) and between different genera (approximately 65–70%).

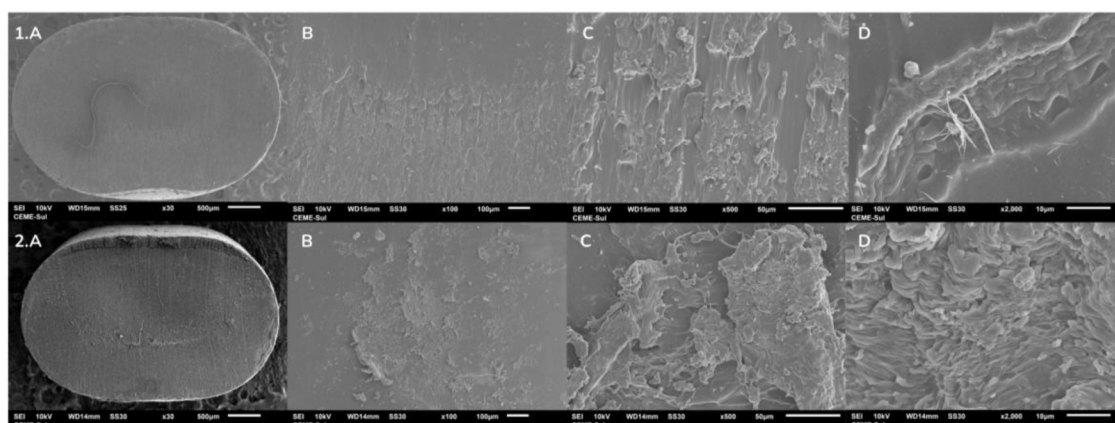


Figure S1. Scanning Electron Microscopy (SEM) micrographs illustrating pristine (1A–1C) and photodegraded (2A–2C) MPs at different magnifications.

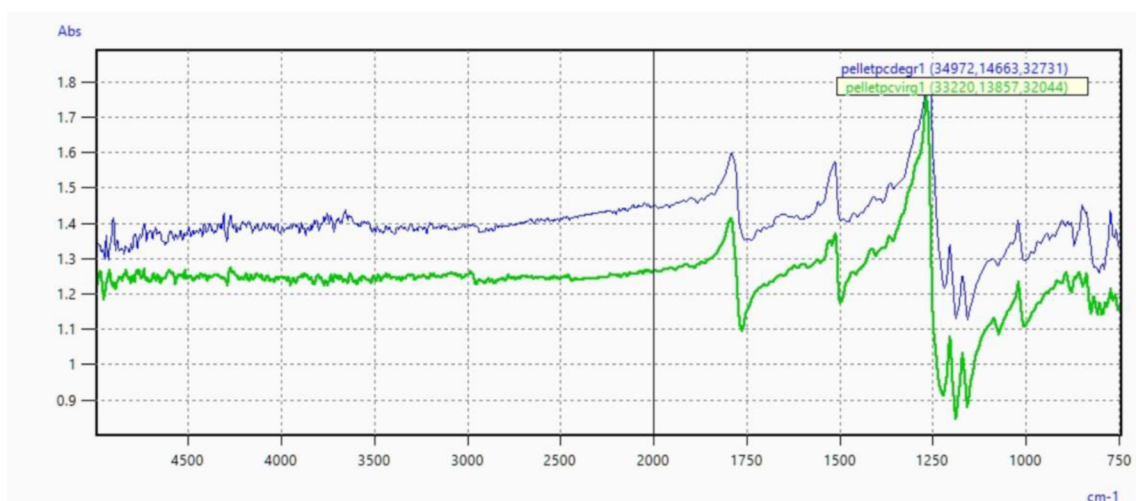


Figure S2. Fourier transform infrared (FTIR) spectra of the polycarbonate (PC) used in the tests. The green curve represents the polymer in its pristine (virgin) form, while the blue curve shows the polymer profile after the photo-oxidation process (degraded). The increase in band intensity in the 1750 cm^{-1} region indicates the formation of carbonyl groups ($\text{C}=\text{O}$), characteristic of the thermal and photochemical degradation of the polymer chain. X-axis: wavenumber (cm^{-1}); Y-axis: absorbance (Abs).

Table S1. Wavenumbers selected for integrating peaks and their baseline.

	Polycarbonate (cm^{-1})
Reference peak	1014 ^(a)
Baseline	1900 - 2100
Carbonyl bond	1840 ^(a)
Baseline	1880 - 1920
Hydroxyl bond	3200 - 3600 ^(a)
Baseline	3800 - 4000

^(a)Diepens et al., 2007.

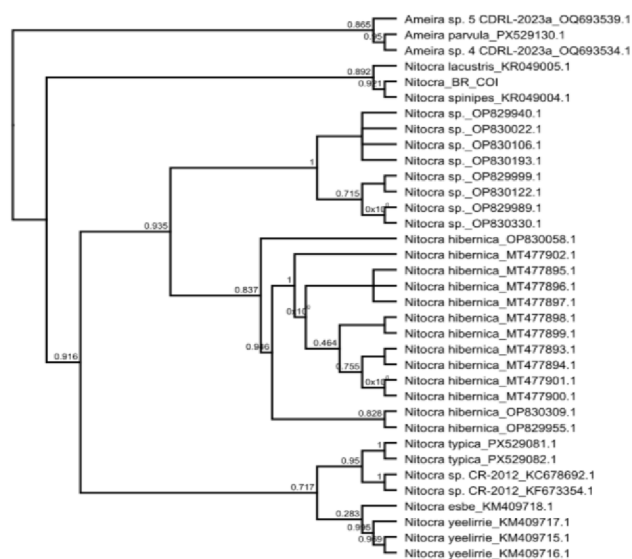


Figure S3. Cladogram based on the COI gene for species of the Ameiridae family, including the sequence from this study.

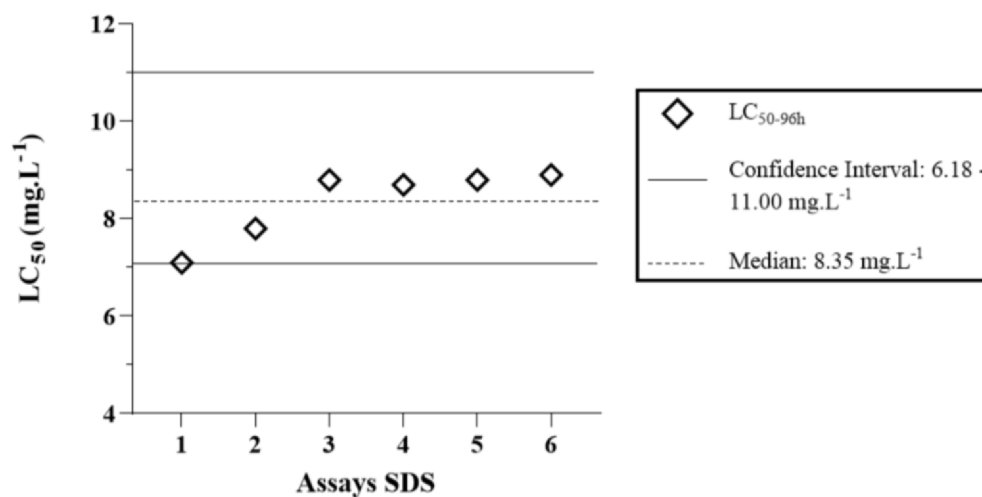


Figure S4. Medium lethal concentration (LC_{50-96h} , $mg \cdot L^{-1}$) values obtained in monthly sensitivity tests with the reference substance Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) for *Nitocra* sp. Each point represents the estimated LC_{50-96h} for an independent test, conducted under controlled conditions of static exposure for 96 h.



Figure S5. Sequence showing grazing activity by *Nitocra* sp on the plathisphere.

Table S2. Results of monthly sensitivity tests with the reference substance Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) for the copepod *Nitocra* sp. Values expressed as median lethal concentration (LC_{50-96h}) and their respective confidence intervals (CI 95%).

Teste	Mês do ensaio	LC_{50-96h} ($mg \cdot L^{-1}$)	Intervalo de Confiança (95%)
1	June 2025	6.9	5.3 - 9.0
2	July 2025	7.8	5.8 - 10.5
3	August 2025	8.8	6.5 - 12.0
4	September 2025	8.7	6.6 - 11.4
5	October 2025	8.8	6.8 - 11.5
6	November 2025	8.9	7.1 - 11.2

Table S3. Monthly means $\pm$ standard deviation (n=1) of physicochemical parameters (pH, dissolved oxygen, temperature and salinity) in chronic tests with SDS initial and final values.

Assay month	pH initial	pH final	OD initial	OD final	Temperature initial	Temperature final	Salinity initial	Salinity final
June 2025	6.73 $\pm$ 0.06	6.89 $\pm$ 0.05	8.37 $\pm$ 0.21	8.32 $\pm$ 0.24	24.98 $\pm$ 0.07	25.02 $\pm$ 0.10	17.25 $\pm$ 0.22	17.45 $\pm$ 0.30
July 2025	6.70 $\pm$ 0.10	6.81 $\pm$ 0.09	8.37 $\pm$ 0.04	9.17 $\pm$ 0.35	24.98 $\pm$ 0.07	24.95 $\pm$ 0.10	17.08 $\pm$ 0.08	17.17 $\pm$ 0.10
August 2025	6.85 $\pm$ 0.08	6.63 $\pm$ 0.24	8.38 $\pm$ 0.03	10.05 $\pm$ 1.46	25.03 $\pm$ 0.05	25.05 $\pm$ 0.05	17.32 $\pm$ 0.07	17.30 $\pm$ 0.11
September 2025	6.38 $\pm$ 0.05	6.42 $\pm$ 0.06	8.35 $\pm$ 0.09	8.37 $\pm$ 0.09	25.00 $\pm$ 0.00	25.00 $\pm$ 0.00	17.15 $\pm$ 0.05	17.30 $\pm$ 0.08
October 2025	6.45 $\pm$ 0.03	6.53 $\pm$ 0.04	8.33 $\pm$ 0.06	8.38 $\pm$ 0.06	25.00 $\pm$ 0.00	25.00 $\pm$ 0.00	17.28 $\pm$ 0.07	17.40 $\pm$ 0.09
November 2025	6.60 $\pm$ 0.03	6.67 $\pm$ 0.03	8.46 $\pm$ 0.04	8.55 $\pm$ 0.06	25.00 $\pm$ 0.00	25.00 $\pm$ 0.00	17.40 $\pm$ 0.08	17.50 $\pm$ 0.08

Table S4. Physicochemical parameters of water during the microplastic plastisphere formation experiment over time. The values refer to hydrogen ion potential (pH), dissolved oxygen (DO), temperature ($^{\circ}$ C), and salinity recorded at different time intervals from 1 to 30 days and at the final stage.

Plastisphere MP insertion parameters				
Concentrations	pH	OD	Temperature	Salinity
30 days	6.25	1.95	23.3	16.14
15 days	7.40	6.80	23.2	16.50
10 days	8.05	7.05	23.6	16.70
5 days	8.15	7.12	23.5	16.90
1 day	8.25	7.26	23.3	17.00
Final	8.35	7.42	23.3	17.10

Table S5. Means $\pm$ standard deviation (n=1) of physicochemical parameters (pH, dissolved oxygen, temperature and salinity) in acute toxicity tests on microplastics (MPs) and copper (Cu) (MPs, Cu, MP+Cu and plastisphere) initial and final values.

Teste	pH initial	pH final	OD initial (ml/L)	OD final (ml/L)	Temperature initial ($^{\circ}$ C)	Temperature final ($^{\circ}$ C)	Salinity initial (PSU)	Salinity final (PSU)
-------	------------	----------	-------------------	-----------------	-------------------------------------	-----------------------------------	------------------------	----------------------

MPs	6.70 ±	6.76 ±	7.68 ±	7.88 ±	25.03 ±	25.03 ±	17.18 ±	17.28 ±
Pristines	0.10	0.07	0.25	0.17	0.01	0.03	0.10	0.10
MPs	7.18 ±	7.25 ±	7.88 ±	8.30 ±	25.03 ±	25.03 ±	17.33 ±	17.53 ±
Photodegradeds	0.10	0.13	0.33	0.23	0.00	0.00	0.12	0.10
Cu	6.72 ±	6.92 ±	7.13 ±	8.30 ±	25.00 ±	25.03 ±	17.13 ±	17.23 ±
	0.22	0.20	0.22	0.19	0.01	0.05	0.16	0.12
LC₅₀ MP + Cu	6.48 ±	6.38 ±	9.30 ±	9.37 ±	25.00 ±	25.00 ±	17.17 ±	17.25 ±
	0.26	0.35	1.91	0.86	0.00	0.00	0.08	0.08
Plastisphere	7.47 ±	7.74 ±	6.60 ±	7.61 ±	25.00 ±	25.03 ±	17.13 ±	17.14 ±
	040	0.78	2.10	0.18	0.00	0.02	0.06	0.01

Table S6. Summary of the analysis of variance (ANOVA) for bacterial density in the plastisphere on polycarbonate (PC) microplastics over exposure time, where df represents degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis.

Source of variation	Gl	Value <i>F</i>	Value <i>p</i>
Plastisphere Maturation	4	428.2	p < 0.001
Total	14		

Table S7. Summary of the analysis of variance (ANOVA) for the concentration of photosynthetic pigments in the plastisphere on polycarbonate (PC) microplastics over the exposure time, where Df represents the degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis.

Source of variation	Gl	Value <i>F</i>	Value <i>p</i>
Plastisphere Maturation	9	10.35	0.000
Cu	1	1.43	0.258
Interaction (Plastisphere x Cu)	9	0.46	0.867
Residue	10		
Total	29		

Table S8. Summary of the analysis of variance (ANOVA) for the different Cu concentrations, where df represents the degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis.

Source of variation	Gl	Value <i>F</i>	Value <i>p</i>
Cu concentrations	3	345.8	< 0.001

Residue	8
Total	11

Table S9. Analysis of Variance (ANOVA) results for mortality of *Nitocra* sp. exposed to pristine and photodegraded microplastics (MPs). Where df represents degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis.

Source of variation	Gl	Value <i>F</i>	Value <i>p</i>
Type of MPs	1	13.83	0.001
Quantity	1	204.32	< 0.001
Interaction (MP x Quantity)	1	6.12	0.022
Residue	20		
Total	23		

Table S10. Analysis of Variance (ANOVA) results for mortality of *Nitocra* sp. exposed to microplastics (MPs) and copper (Cu). Where df represents degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis.

Source of variation	Gl	Value <i>F</i>	Value <i>p</i>
MPs	1	8.59	0.010
Cu	1	5.78	0.029
MPs + Cu	5	68.11	< 0.001
Residue	12		
Total	17		

Table S11. Analysis of Variance (ANOVA) results for mortality of *Nitocra* sp. exposed to different maturities of isolated plastispheres and associated with Cu. Where df represents degrees of freedom, F-value indicates the test statistic, and p-value the significance level determined by the analysis.

Source of variation	Gl	Value <i>F</i>	Value <i>p</i>
Maturation Plasticsphere	10	7.82	0.001
Cu	1	0.04	0.831
Maturation Plasticsphere x Cu	10	1.20	0.382
Residue	11		
Total	32		

Table S12. Monitoring of Cu concentrations measured in water ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) via Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) in toxicity tests with Polycarbonate (PC) microplastics (MPs). Values are expressed as mean and standard error for the initial and final times (96 hours). Values identified as n.d. correspond to samples where the analyte was not detected by the equipment.

Treatment	Mean ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Standard Deviation	Standard Error
Initial Control	0	0	0
0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ initial	0.12915	0.001979	0.0014
0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ initial	0.89525	0.53241	0.376475
1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ initial	1.484	0.837	0.48324
2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ initial	2.7185	0.039	0.022516
4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ initial	5.165	0.05165	0.02982
Final Control	0	0	0
0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ final	0.124625	0.17115	0.121025
0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ final	0.3964	0.3381	0.2391
1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ final	1.0985	0.006	0.003464
2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ final	2.186	0.02186	0.01262
4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ final	3.8375	0.007	0.00404
Initial Control	0	0	0
0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cu}$ initial	0.3754	0.018	0.01039
0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cu}$ final	0.338	0.042	0.02424
0.50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cu}$ initial	0.89	0.012	0.006928
0.50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cu}$ final	0.7495	0.037	0.021361
5 MPs + 0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu initial	0.36277	0.00539	0.000785
5 MPs + 0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu final	0.23216	0.0000562	0.00003247
10 MPs + 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu initial	0.67181	0.00825	0.000431
10 MPs + 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu final	0.41564	0.0000333	0.000019
Final Control	0	0	0
Plastisphere initial control	0	0	0
0.25 Cu initial Plastisphere	0.6075	0.034	0.01962
0.25 Cu Control Plastisphere	0.4472	0.133	0.076787
5 MPs + 0.25 Cu 1 final	0.35295	0.003529	0.00203
5 MPs + 0.25 Cu 5 final	0.29705	0.042	0.024248
5 MPs + 0.25 Cu 10 final	0.27654	0.044	0.0254
5 MPs + 0.25 Cu 15 final	0.23216	0.126	0.07274
5 MPs + 0.25 Cu 30 final	0.17367	0.086	0.0496
Plastisphere final control	0	0	0
1 MP Pristine	0	0	0
10 MPs Pristines	0	0	0
1 MP Photodegraded	0	0	0
10 MPs Photodegradeds	0	0	0

Capítulo V: Síntese da Discussão

A transição do microplástico de um substrato inerte para um nicho biológico complexo é o eixo central para compreender a toxicidade observada no presente estudo. A análise da superfície do policarbonato após a fotodegradação, revelou um aumento acentuado na área disponível para colonização e na reatividade química, evidenciada pela presença de grupos funcionais oxigenados. Estas características não são meros danos estruturais, mas modificações que permitem ao polímero reter contaminantes inorgânicos. A habilidade da plastisfera em selecionar taxas tolerantes ao cobre, como observamos na dominância de grupos especializados, sugere que o ambiente de biofilme não é uma entidade passiva, mas um sistema que responde ativamente a pressão seletiva imposta pelo metal.

A dinâmica observada nas comunidades bacterianas e eucarióticas ao longo de trinta dias, revela que a plastisfera passa por uma sucessão previsível e estruturada. O declínio dos colonizadores iniciais e a persistência de taxas oportunistas, indicam que o plástico envelhecido oferece recursos distintos para a microbiota. Quando adicionamos o cobre a este sistema, a seletividade é intensificada. A dominância de microrganismos capazes de tolerar altas concentrações de metais, observada também em estudos de ambientes controlados, confirma que o metal molda a composição funcional da plastisfera. O ponto crítico desta discussão reside na aparente contradição entre a redução do cobre dissolvido na fase aquosa e o aumento da toxicidade para o copépode.

Os dados de espectrometria sugerem que a plastisfera remove o metal da fase solução. Contudo, a integração destes dados com os ensaios de mortalidade aponta que o metal não é eliminado do sistema, mas retido na matriz orgânica. Por ser um organismo bentônico e detritívoro, o copépode *Nitocra* sp. interage diretamente com a plastisfera. Ao manipular esse material, ele pode ingerir parte dessa matriz orgânica, que entrega uma carga concentrada de contaminante. Portanto, a plastisfera pode atuar como um sistema de concentração de poluentes que facilita a transferência do metal diretamente para o organismo detritívoro. A toxicidade aumenta conforme a plastisfera amadurece, sugerindo que quanto mais complexa e estruturada a matriz de substâncias poliméricas extracelulares, maior a sua capacidade de manter o metal retido e, conseqüentemente, mais perigosa a partícula se torna para o copépode. A comparação com o material prístino evidencia que o risco ecotoxicológico é uma função combinada da degradação física do plástico e da sucessão biológica do biofilme, componentes que devem ser analisados em conjunto.

Capítulo VI: Conclusões

A investigação demonstrou que a toxicidade do policarbonato para *Nitocra* sp. é modulada significativamente pelo envelhecimento abiótico do material e pela sucessão ecológica da plastisfera. A fotodegradação desempenha um papel chave ao elevar a reatividade superficial, fornecendo as condições físico-químicas necessárias para a absorção do cobre. O fator determinante para a severidade dos efeitos letais observados é o tempo de maturação da plastisfera, dado que a comunidade estabelecida após trinta dias potencializa a toxicidade para o copépode de maneira superior aos estressores isolados. A plastisfera madura funciona como um reservatório de contaminantes, concentrando o cobre e facilitando a sua transferência para a biota através da ingestão, superando o efeito de sequestro do metal da fase líquida. Estes achados indicam que o risco

ecotoxicológico dos microplásticos envelhecidos é substancialmente maior do que o estimado para partículas pristinas, configurando um cenário de ameaça que exige modelos de avaliação mais integrados.

Capítulo VII: Perspectivas Futuras

A complexidade das interações reveladas neste estudo motiva a expansão das investigações para cenários que contemplem a dinâmica detalhada das respostas biológicas. Recomenda-se que estudos futuros abordem os efeitos de exposições crônicas, avaliando não apenas a sobrevivência, mas parâmetros de aptidão biológica como a fecundidade e a taxa de eclosão de *Nitocra* sp. diante da manipulação prolongada da plastisfera e da potencial ingestão de frações dessa matriz orgânica. Adicionalmente, é pertinente avaliar como os mecanismos biogeoquímicos que regulam a adsorção e a dessorção competitiva de misturas de metais-traço (cobre, zinco e chumbo) e a dinâmica de patógenos portadores de genes de resistência antimicrobiana na plastisfera de policarbonato são influenciados por pulsos abruptos de água doce causados por eventos hidrológicos extremos. A utilização de técnicas moleculares para mapear a expressão gênica do copépode após a exposição, poderia fornecer

detalhes sobre os mecanismos metabólicos de resposta ao estresse gerado pela plastisfera. Finalmente, ampliar esta abordagem experimental para outras linhagens de harpacticóides permitirá verificar se a vetorização de contaminantes via plastisfera é um processo generalizado, fortalecendo a base científica para o monitoramento de contaminantes emergentes sob a perspectiva integrada de Saúde Única.

Capítulo VIII: Referências Bibliográficas

Agostini, V. O., Macedo, A. J., & Muxagata, E. (2018). O papel do biofilme bacteriano no acoplamento bentopelágico, durante o processo de bioincrustação. *Revista Liberato*, 19(31), 23 a 42.

Agostini, V. O., Terres Rodrigues, L., Macedo, A. J., & Muxagata, E. (2021). Comparison of techniques for counting prokaryotes in marine planktonic and biofilm samples. *Sci. Mar.*, 85(3), 211 a 220.

Alavi Nikje, M. M., & Askarzadeh, M. (2013). Green and inexpensive method to recover Bisphenol A from polycarbonate wastes. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 23(1), 29 a 31.

Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., & Mincer, T. J. (2020). Ecology of the plastisphere. *Nat. Rev. Microbiol.*, 18(3), 139 a 151.

Andrady, A. L., Barnes, P. W., Bornman, J. F., Gouin, T., Madronich, S., White, C. C., Zepp, R. G., & Jansen, M. A. K. (2022). Oxidation and fragmentation of plastics in a changing environment; from UV radiation to biological degradation. *Sci. Total Environ.*, 851, 158022.

Arpia, A. A., Chen, W. H., Ubando, A. T., Naqvi, S. R., & Culaba, A. B. (2021). Microplastic degradation as a sustainable concurrent approach for producing biofuel and obliterating hazardous environmental effects: a state of the art review. *J. Hazard. Mater.*, 418, 126381.

Atlas do Plástico. (2020). *Atlas do plástico: fatos e números sobre o mundo dos polímeros sintéticos*. Rio de Janeiro, Brasil: Fundação Heinrich Böll.

Baekeland, L. H. (1909). The synthesis, constitution, and uses of bakelite. *Ind. Eng. Chem.*, 1(3), 149 a 161.

Benner, I., & Passow, U. (2024). Why biofouling cannot contribute to the vertical transport of small microplastic. *Micropl. & Nanopl.*, 4, 19.

Berman, T., & Passow, U. (2007). Transparent exopolymer particles (TEP): an overlooked factor in the process of biofilm formation in aquatic environments. *Nature Precedings*, 1182.1.

Beyer, J., Petersen, K., Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T., & Tollefsen, K. E. (2014). Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: a discussion paper. *Mar. Environ. Res.*, 96, 81 a 91.

Cao, Y., Zhao, M., Ma, X., Song, Y., Zuo, S., Li, H., & Deng, W. (2021). A critical review on the interactions of microplastics with heavy metals: Mechanism and their combined effect on organisms and humans. *Sci. Total Environ.*, 788, 147620.

Carpenter, E. J., & Smith Jr., K. L. (1972). Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science*, 175(4027), 1240 a 1241.

Chen, H., Wang, X., Yin, H., Sun, L., Yang, X., Zhong, W., Kong, L., & Liu, L. (2025). Microplastic surface biofilms: a review of structural assembly, influencing factors, and ecotoxicity. *Front. Mar. Sci.*, 12, 1701766.

Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA. (2005). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília, DF.

Dey, S., Rout, A. K., Behera, B. K., & Ghosh, K. (2022). Plastisphere community assemblage of aquatic environment: plastic microbe interaction, role in degradation and characterization technologies. *Environmental Microbiome*, 17, 32.

Djaoudi, K., Tesan Onrubia, J. A., Boukra, A., Guesnay, L., Portas, A., Barry Martinet, R., Angeletti, B., Mounier, S., Lenoble, V., & Briand, J. F. (2022). Seawater copper content controls biofilm bioaccumulation and microbial community on microplastics. *Sci. Total Environ.*, 814, 152278.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(9), 623 a 633.

Galgani, F., & Rangel Buitrago, N. (2024). White tides: The plastic nurdles problem. *Journal of Hazardous Materials*, 470, 134250.

Ghiglione, J. F., Barbe, V., Bruzard, S., Burgaud, G., Cachot, J., Eyheraguibel, B., Lartaud, F., Ludwig, W., Meistertzheim, A. L., Paul Pont, I., Pesant, S., Ter Halle, A., Thiebeauld, O., & Mission Tara Microplastics Consortium. (2025). Mission Tara Microplastics: a holistic set of protocols and data resources for the field investigation of plastic pollution along the land sea continuum in Europe. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 32(16), 10032 a 10049.

Hanvey, J. S., Lewis, P. J., Lavers, J. L., Crosbie, N. D., Pozo, K., & Clarke, B. O. (2017). A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments. *Anal. Methods*, 9(9), 1369 a 1383.

Holmes, L. A., Turner, A., & Thompson, R. C. (2012). Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environmental Pollution*, 160, 42 a 48.

Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768 a 771.

Jolaosho, T. L., Rasag, M. F., Omotoye, E. V., Araomo, O. V., Adekoya, O. S., Abolaji, O. Y., & Hungbo, J. J. (2025). Microplastics in freshwater and marine ecosystems: Occurrence, characterization, sources, distribution dynamics, fate, transport processes, potential mitigation strategies, and policy interventions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 294, 118036.

Karlsson, T. M., Lavers, J. L., Youngman, A., Almroth, B. C., Takada, H., Morales Caselles, C., Carpenter, E. J., Arias, A. H., Withanage, H., Gharbi, S., & Rist, S. (2026). Decades of scientific research show that plastic pellets pose hazards to the environment. *Cambridge Prisms: Plastics*, 4, e5.

Kuang, Z., Shi, Z., Wang, H., Du, S., Gong, H., Liu, Q., Gu, Y., Fan, Z., Huang, H., & Wang, S. (2024). Bioavailability of trace metals in sediments from Daya bay nature reserve: Spatial variation, controlling factors and the exposure risk assessment for aquatic biota. *Ecol. Indic.*, 169, 112789.

Kuwae, M., Kinugawa, K., Masuhara, T., Tsugeki, N., & Hinata, H. (2026). Coastal marine sediments as a major sink for small microplastics: Evidence from a ~100 year varved sediment record. *Sci. Total Environ.*, 1043, 181935.

Li, W., & Chen, P. J. (2025). Integrating bioavailability and toxicity of copper in estuarine sediments using whole sediment exposure with medaka embryos. *Sci. Total Environ.*, 1001, 180514.

Liu, S., Shi, J., Wang, J., Dai, Y., Li, H., Li, J., Liu, X., Chen, X., Wang, Z., & Zhang, P. (2021). Interactions Between Microplastics and Heavy Metals in Aquatic Environments: A Review. *Front. Microbiol.*, 12, 652520.

Lopes, T. O. M., Silveira, C. R. D., Araujo da Silva, J., Guedes, T., Tavella, R. A., Rola, R. C., Marques, J. A., Vieira, C. E. D., Bianchini, A., & Martins, C. M. G. (2025). A six year ecotoxicological assessment of the Doce river and coastal marine areas impacted by the Fundão tailings dam failure, Brazil. *Environ. Pollut.*, 371, 125897.

Lotufo, G. R., & Abessa, D. M. S. (2002). Toxicity tests with whole sediment and estuarine interstitial water using benthic copepods. In: Nascimento, I. A., Sousa, E. C. P. M., & Nipper, M. G. (Eds.), *Methods in marine ecotoxicology: applications in Brazil*. Sao Paulo: Artes Graficas, pp. 151 a 162.

Luo, H., Liu, C., He, D., Xu, J., Sun, J., Li, J., & Pan, X. (2022). Environmental behaviors of microplastics in aquatic systems: A systematic review on degradation, adsorption, toxicity and biofilm under aging conditions. *J. Hazard. Mater.*, 423(Pt A), 126915.

Ma, W., Peng, D., Walker, S. L., Cao, B., Gao, C. H., Huang, Q., & Cai, P. (2017). *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 3, 4.

Marreto, R. N., Baumgarten, M. G. Z., & Wallner Kersanach, M. (2017). Trophic quality of waters in the Patos Lagoon estuary: a comparison between its margins and the port channel located in Rio Grande, RS, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 29, e11.

Masó, M., Fortuño, J. M., De Juan, S., & Demestre, M. (2016). Microfouling communities from pelagic and benthic marine plastic debris sampled across Mediterranean coastal waters. *Sci. Mar.*, 80(1), 117 a 127.

Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., & Kaminuma, T. (2001). Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental Science & Technology*, 35(2), 318 a 324.

- Mendonga, J. M. S., Navoni, J. A., Medeiros, G. F., & Mina, I. M. P. (2022). Toxicity tests for the evaluation of estuarine surface waters using *Nitocra* sp. as an alternative test organism. *Acta Toxicol. Argent.*, 30(3), 5.
- Millero, F. J., Woosley, R., Ditrolio, B., & Waters, J. (2009). Effect of Ocean Acidification on the Speciation of Metals in Seawater. *Oceanography*, 22(4), 72 a 85.
- Morais, L. G., Dos Santos, H. F., Monteiro, D. A., Mascarenhas, M. M., Portela, H. A., da Costa Marques, M. R., & de Araújo, V. F. (2026). Microbial diversity and potential pathogens associated with the plastisphere on beaches of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 57(1), 75.
- Moustaghfir, A., Rivaton, A., Mailhot, B., & Jacquet, M. (2020). Improved durability of Bisphenol A polycarbonate by bilayer ceramic nanocoatings alumina zinc oxide. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 30(3), e2020029.
- Moyal, J., Dave, P. H., Wu, M., Karimpour, S., Brar, S. K., Zhong, H., & Kwong, R. W. (2023). Impacts of biofilm formation on the physicochemical properties and toxicity of microplastics: a concise review. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 261(1), 8.
- Oberbeckmann, S., Osborn, A. M., & Duhaime, M. B. (2016). Microbes on a Bottle: Substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris. *PLoS One*, 11(8), e0159289.
- Oleinski, B., Carneiro, T., das Neves, L. O., Morales, M. L. P., & Albertoni, E. F. (2026). Preference by the nymphs of *Americabaetis alphas* Lugo Ortiz and

McCafferty, 1996 (Baetidae: Ephemeroptera) for feeding substrate and food size under laboratory conditions. *Neotrop. Entomol.*, 55, 15.

Palomo, A., Ma, Y., Dechesne, A., Aamand, J., & Zheng, Y. (2026). Sediment microbiome in reclaimed water influenced rivers insensitive to trace sulfonamides: Implications for antibiotic risk assessment. *Ecological Frontiers*, 46(3), 1074 a 1082.

Pickett, J. A. (2011). Influence of photo Fries reaction products on then photodegradation of bisphenol A polycarbonate. *Polymer Degradation & Stability*, 96(12), 2253 a 2265.

Pilson, M. E. Q. (2013). *An introduction to the chemistry of the sea* (Second edition). Cambridge: Cambridge University Press.

Pinheiro, L. M., Andreola, L. T., Mendes, C. R. B., Morales, M. L. P., Agostini, V. O., & Pinho, G. L. L. (2026). Salt marsh zonation and substrate type modulation for plastisphere: an experimental assessment in the Lagoon Patos estuary in extreme south of Brazil. *Arch. Microbiol.*, 208, 232.

Ramsperger, A. F. R. M., Stellwag, A. C., Caspari, A., Fery, A., Lueders, T., Kress, H., Löder, M. G. J., & Laforsch, C. (2020). Structural diversity in early stage biofilm formation on microplastics depends on environmental medium and polymer properties. *Water*, 12(11), 3216.

Redjala, S., Aït Hocine, N., Ferhoum, R., Gratton, M., Poirot, N., & Azem, S. (2020). UV Aging Effects on Polycarbonate Properties. *J. Fail. Anal. Prev.*, 20(6), 1907 a 1916.

Rodrigues, E. A., Carvalho, A. R. d., Ferreira, M. L., Victor, R. A. B. M., Luca, E. F. d., Rocha, G. C. d., Carvalho, B. R. d., Bustillos, J. O. W. V., Sodré, M. G., Oliveira, M. C., Jurema, B., & Andrade, D. A. d. (2024). Beyond the rising tide: Towards effective climate policy in coastal urban centers. *Land*, 13(12), 2071.

Rubasinghe, C., Brosché, S., Withanage, H., Pathragoda, D., & Karlsson, T. (2022). *X Press Pearl: A 'New Kind of Oil Spill'. A Toxic Mix of Plastics and Invisible Chemicals*. Gothenburg: IPEN.

Sarmiento, V. C., & Santos, P. J. P. (2012). Species of Harpacticoida (Crustacea, Copepoda) from the phytal of Porto de Galinhas coral reefs, northeastern Brazil. *Check List*, 8(5), 936.

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall Stoodley, L., Burmolle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 20(10), 608 a 620.

Seewoo, B. J., Wong, E. V. S., Mulders, Y. R., Goodes, L. M., Eroglu, E., Brunner, M., Wood, F., Fitzgerald, S. M., Moran, C. J., & Smith, N. M. (2024). Impacts associated with the plastic polymers polycarbonate, polystyrene, polyvinyl chloride, and polybutadiene across their life cycle: A review. *Heliyon*, 10(12), e32912.

Silva, L. F., Soroldoni, S., Kessler, F., Fernandes, A. N., & Pinho, G. L. (2023). Influence of UV exposure time and simulated marine environment on different microplastic degradation. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 30(52), 121450 a 121464.

Soroldoni, S. G. (2017). *Problemática relacionada com a ocorrência ambiental de partículas de tintas anti incrustantes no Estuário da Lagoa dos Patos, RS*,

Brasil. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

Versteeg, D. J., Stalmans, M., Dyer, S. D., & Janssen, C. (1997). Ceriodaphnia and daphnia: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere*, 34, 869 a 892.

Wang, F., Goulet, R. R., & Chapman, P. M. (2004). Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: the gap between laboratory and nature. *Chemosphere*, 57, 1713 a 1724.

Wang, Q., Zhang, Y., Yang, Q., Fu, S., Qu, B., & Defoirdt, T. (2021). One health pathogen surveillance demonstrated the dissemination of gut pathogens within the two coastal regions associated with intensive farming. *Gut Pathog.*, 13, 47.

Wright, R. J., Erni Cassola, V., Gibson, M. I., & Christie Oleza, J. A. (2020). Marine plastic debris: a new surface for microbial colonization. *Environmental Science & Technology*, 54(19), 11657 a 11672.

Zettler, E. R., Mincer, T. J., & Amaral Zettler, L. A. (2013). Life in the "Plastisphere": Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ. Sci. Technol.*, 47(13), 7137 a 7146.