

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Scienze Naturali**

**ELABORATO DI LAUREA**

**Effetti di analoghi del Bisfenolo A su  
*Phaeodactylum tricornutum***

**Tutor: Prof. Valerio Matozzo  
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott. Jacopo Fabrello  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Sofia Guidorizzi**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
1.1 I bisfenoli.....	1
1.2 BPA: il bisfenolo primario .....	1
1.3 Analoghi del BPA: BPAF, BPF e BPS .....	2
1.4 BPAF, BPF e BPS: struttura e impiego.....	3
1.5 BPAF, BPF e BPS: tossicità e resistenza ambientale .....	4
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>6</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>7</b>
3.1 Organismo modello.....	7
3.2 Stabulazione ed esposizione.....	7
3.3 Omogeneizzazione dei campioni .....	8
3.4 Capacità antiossidante totale (CUPRAC) .....	8
3.5 Attività dell'enzima superossido dismutasi (SOD).....	8
3.6 Attività della catalasi (CAT) .....	9
3.7 Attività della glutazione reduttasi (GR).....	9
3.8 Attività della glutazione perossidasi (GPX).....	9
3.9 Attività della glutazione S-transferasi (GST) .....	10
3.10 Attività di ascorbato perossidasi (APX) .....	10
3.11 Perossidazione lipidica (LPO).....	10
3.12 Contenuto carbonilico nelle proteine (PCC) .....	10
3.13 Proteine totali per campione (Bradford).....	11
3.14 Analisi statistica .....	11
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>12</b>
4.1 CUPRAC.....	12
4.2 Attività della SOD.....	13
4.3 Attività della CAT .....	14
4.4 Attività di GR.....	15
4.5 Attività di GPX.....	16
4.6 Attività di GST .....	17
4.7 Attività di APX.....	18
4.8 LPO .....	19
4.9 PCC .....	20
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>21</b>

<b>6. CONCLUSIONE.....</b>	<b>26</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>27</b>

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 I bisfenoli

I bisfenoli sono una classe di composti chimici costituiti da due fenoli connessi da un gruppo alchilico, a cui poi si aggiungono o si sostituiscono diversi gruppi funzionali a seconda dello specifico composto. Il principale bisfenolo è il bisfenolo A (BPA), che è stato sintetizzato nel 1891 come estrogeno artificiale (Johanna R. Rochester, 2013) la cui principale proprietà era quella di agire da plastificante una volta trasformato in forma polimerica. Da allora questo composto e i suoi analoghi sono largamente utilizzati nella produzione di policarbonati, resine epossidiche, carta termica e polivinilcloruro (Vandenberg et al., 2009). Grazie alle peculiari proprietà di resistenza alle alte temperature, alla corrosione da parte di acidi e oli e alla trasparenza (Vasiljevic and Harner, 2021), i policarbonati sono ampiamente impiegati in stoviglie e contenitori per alimenti e bevande, mentre le resine epossidiche rivestono l'interno delle lattine in metallo e di serbatoi di contenimento di acqua potabile (Catenza et al., 2019). I bisfenoli sono impiegati anche nella produzione di una vasta gamma di prodotti ad uso non alimentare come gli scontrini fiscali, i giocattoli, le lenti a contatto, alcune componenti elettroniche, ritardanti di fiamma, componenti mediche, vernici ed inchiostri per stampanti (Wang et al., 2016; Björnsdotter et al., 2017; Geens et al., 2012a). La loro vasta diffusione nei prodotti di consumo ha portato ad una crescente attenzione verso il ruolo eco-tossicologico che svolgono per l'uomo e per altri organismi, in particolare come interferenti endocrini.

### 1.2 BPA: il bisfenolo primario

Il 4,4'-isopropylidenediphenol (Fig. 1), meglio conosciuto come BPA, è stato sintetizzato dal chimico russo A.P. Dianin e utilizzato per scopi commerciali a partire dagli anni '30, per diventare poi il principale componente nell'industria della plastica tra gli anni '40 e '50 (Rubin et al., 2011). A causa della rapida crescita dell'impiego dei prodotti in policarbonato, resine epossidiche e polisolfoniche, il BPA è diventato in poco tempo uno dei composti chimici più utilizzati e di conseguenza uno dei più prodotti (Vandenberg et al., 2007; Encyclopedia of Environmental Health, 2019). La produzione mondiale, infatti, è andata man mano crescendo: nel 2002 si è registrato un totale di 2.8 milioni di tonnellate di BPA (Rochester, 2013), per passare a 7.7 tonnellate nel 2015 e si stima possa raggiungere quota 10.6 tonnellate nel 2022 (Almeida et al., 2018). L'Asia è responsabile del 53% della produzione totale, seguita dall'Europa (25%) e dal Nord America (18%) (Merchant Research and Consulting Ltd, 2013).

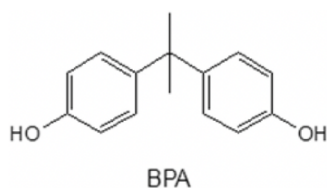


Fig 1: formula di struttura del bisfenolo A

La produzione di massa e l'uso frequente di BPA hanno portato ad un sostanzioso rilascio e un'ampia diffusione nell'ambiente naturale di questa sostanza; è stato infatti misurato in concentrazioni rilevanti in suoli di Stati Uniti, Europa e Corea, nelle acque superficiali e nei sedimenti fluviali di tutto il mondo con picchi a Taiwan e Cina (Huang et al., 2012). È stata inoltre riportata la presenza diffusa di BPA anche nell'atmosfera di aree urbane in India, Cina, Giappone, U.S. ed Europa (Fu and Kawamura, 2010).

Con la crescente domanda di BPA, materiali contenenti BPA e prodotti usa e getta, il rilascio e l'accumulo in natura di BPA sono probabilmente destinati ad aumentare (Xiao et al., 2020). Studi biologici e tossicologici hanno confermato che questo composto può avere un impatto molto negativo sia sull'ambiente sia sugli organismi esposti (Volkel, 2017), come è già stato dimostrato sulla salute umana. Numerose indagini hanno infatti dimostrato la presenza di BPA in sangue, urine, tessuto adiposo, placenta e liquido amniotico (Gerona et al., 2013; Chen et al., 2015; Geens et al., 2012b; Aris, 2014), connettendo l'ubiquità di questo composto a diversi disturbi, tra cui patologie legate alla riproduzione e alla fertilità, tumori e disturbi cardiovascolari, obesità infantile e diabete di tipo 2 (Lang et al., 2009; Rochester, 2013; Rancière et al., 2015; Khalil et al., 2014).

Nel mondo animale si è notata una forte correlazione tra l'esposizione ad alte concentrazioni di BPA e l'insorgenza in pesci, anfibi, rettili e uccelli di una variazione nella sex ratio; inoltre, nei vertebrati un'esposizione anche a concentrazioni ridotte di BPA può causare disgenesi gonadica ed altre disfunzioni legate alla riproduzione (Guo et al., 2017).

### 1.3 Analoghi del BPA: BPAF, BPF e BPS

La preoccupazione riguardo la possibile esposizione dell'uomo e gli effetti sulla salute ad essa associati hanno portato ad una regolazione della produzione e dell'uso di BPA in USA e in Unione Europea. Le prime norme riguardanti il BPA riguardano il divieto di importazione e vendita di biberon per bambini in polycarbonato introdotto in Canada e Unione Europea rispettivamente nel 2010 e

2011 (Government of Canada, 2013; The European Commission, 2013). Nel 2020 l'Unione Europea ha limitato l'uso di BPA nella carta termica ad un massimo di 0,02% in peso (UE. Regolamento 2016/2235). La presenza crescente di regolamentazioni, insieme alle informazioni disponibili in letteratura scientifica sulla tossicità del BPA, ha stimolato lo sviluppo e la produzione di sostanze alternative che potessero sostituirlo in molte delle sue applicazioni.

Sono quindi stati sintetizzati gli analoghi del BPA, un totale di 17 composti chimici che condividono con esso la struttura chimica di base e differiscono tra loro sia per il gruppo chimico tra i due gruppi fenolici, sia per la presenza di altri gruppi funzionali aggiuntivi (ECHA. Assessment of Regulatory Needs, 2021). Tra questi, il bisfenolo AF (BPAF), il bisfenolo S (BPS) e il bisfenolo F (BPF) sono i principali sostituti nella produzione di plastiche in policarbonato e resine epossidiche. La forte somiglianza chimica con il BPA porta a classificare anche i bisfenoli analoghi come sostanze attive dal punto di vista ormonale, oltre che come contaminanti emergenti (Rochester et al., 2015). Nonostante questo, gli studi e le ricerche sugli effetti di questi bisfenoli sono ancora molto limitati, specialmente rispetto alla letteratura presente sul bisfenolo A.

#### 1.4 BPAF, BPF e BPS: struttura e impiego

Il bisfenolo AF (4,4'-hexafluoroisopropylidenediphenol) è un analogo del BPA in cui i due gruppi metilici centrali sono stati sostituiti da due gruppi trifluorometilici (Fig. 2). Rispetto agli analoghi sotto analizzati, questo bisfenolo è utilizzato in minor misura; è impiegato nella sintesi di resine epossidiche, oltre che nella produzione di fluoroelastomeri, componenti elettroniche e fibre ottiche.

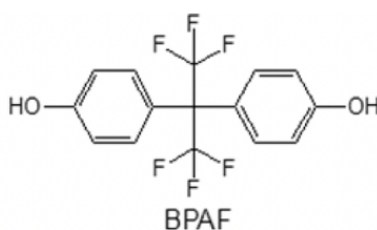


Fig. 2: formula di struttura del bisfenolo AF

Il bisfenolo F (o 4,4'-methylenediphenol), invece, è caratterizzato da due gruppi fenolici connessi da un metilene (Fig. 3) e anch'esso trova il suo impiego nella produzione di resine epossidiche, in particolare quelle che conferiscono un'alta resistenza e una lunga durata come serbatoi e tubi per il trasporto di acqua, pavimenti industriali. È molto utilizzato anche in un ampio spettro di beni di

consumo, tra cui lacche, vernici, adesivi in plastica, sigillanti dentali e imballaggi alimentari (Rochester et al., 2015).

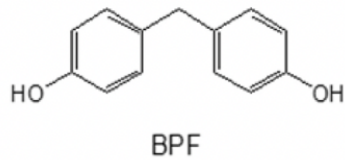


Fig. 3: formula di struttura del bisfenolo F

Il 4,4'-hydroxyphenyl sulfone, o più comunemente noto come bisfenolo S, infine, presenta un gruppo solfonile al posto dei gruppi metilici centrali (Fig. 4). È stato sintetizzato per la prima volta nel 1869 e oggi viene utilizzato principalmente nella formulazione delle colle epossidiche, rivestimenti interni di lattine in metallo e carta termica per scontrini, compresa quella classificata come “carta senza BPA” (Yang et al., 2014), oltre che in inchiostri e agenti abbronzanti (Naderi et al., 2014).

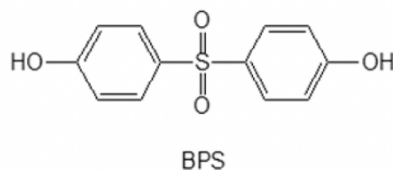


Fig. 4: formula di struttura del bisfenolo S

### 1.5 BPAF, BPF e BPS: tossicità e resistenza ambientale

Nonostante queste sostanze siano state presentate come alternative sicure al bisfenolo A, alcuni studi hanno già riportato alcuni effetti tossici causati dalla diffusione di questi composti in ambiente. Tra tutti, la caratteristica che per prima li rende ugualmente problematici al BPA è la loro azione di interferenti endocrini, ovvero “sostanze esogene che alterano la funzione del sistema endocrino e causano effetti avversi nella salute dell’organismo o della sua progenie” (Degen et al., 2000). Un’indagine recente di Rochester e Bolden ha dimostrato l’attività simil-ormonale di BPF e BPS, confermando che le attività estrogeniche, anti-estrogeniche, androgeniche e anti-androgeniche sono pari o superiori a quelle del BPA (Rochester et al., 2015).

In particolare, BPS mima l’azione degli estrogeni, alterando la crescita uterina e gonadica (Yamasaki et al., 2004; Ji et al., 2013), avendo rilevanti effetti sulla sex ratio, sulla dimensione corporea e gonadica e la concentrazione di testosterone ed estradiolo nel sangue di Zebrafish (*Danio rerio*). Tutti questi effetti portano a



notevoli interferenze col processo riproduttivo di un'ipotetica popolazione esposta (Naderi et al., 2014).

In maniera analoga, il BPF si è dimostrato un agente estrogenico, androgenico e tiroidogenico in diverse specie di ratto: nel primo caso si è notato un effetto sulla crescita uterina (Stroheker et al., 2003; Yamasaki et al., 2004), nel secondo un'alterazione del peso medio dei testicoli, mentre nel terzo e ultimo caso il peso medio della tiroide e della concentrazione di ormone tiroideo (Higashihara et al., 2007). Oltre a questi effetti, nel caso del BPF sono stati evidenziati anche effetti fisiologici e biochimici, tra cui citotossicità, disfunzioni cellulari, danni al DNA e aberrazioni cromosomiche (Audebert et al., 2011; Cabaton et al., 2009; Lee et al., 2013; Nakagawa et al., 2000; Pisapia et al., 2012).

Anche BPAF ha mostrato attività estrogenica e antiandrogenica, motivo per cui è stato il primo ad essere classificato dall'ECHA (European Chemical Agency) come "sostanza che può danneggiare il feto, che causa danni agli occhi e vari organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta ed è molto tossica per gli organismi acquatici" (ECHA, 2019).

Mentre i dati sulla produzione e diffusione ambientale di BPA sono abbondanti in letteratura, quelli disponibili riguardanti i tre bisfenoli appena citati sono molto scarsi. Ad ogni modo, secondo gli studi compiuti sulla biodisponibilità e la resistenza ambientale di questi composti, il BPAF è il bisfenolo con la più elevata persistenza in ambiente, in quanto, contrariamente agli altri analoghi, esso non risente dell'effetto della degradazione microbica e fotochimica. In particolare, è stato dimostrato che in ambiente acquatico BPF degrada molto più velocemente di BPA, mentre BPS e BPAF sono molto più resistenti di BPA alla biodegradazione (Danzl et al., 2009; Ike et al., 2006).

In generale, tutti e tre gli analoghi sono stati rilevati in acque di mare in concentrazioni che variano dalle decine alle centinaia di ng/L nel Sud ed Est della Cina, (Zhao et al., 2019; Xie et al., 2022) fino alle migliaia di ng/L nel mare della Cina meridionale e nella baia di Tokyo (Zhao et al., 2019; Yamazaki et al., 2015), mentre nelle acque superficiali di Cina e Giappone raggiungono spesso le migliaia di ng/L. (Yamazaki et al., 2015; Huang et al., 2018; Fabrello et al., 2022).

## 2. SCOPO DELLA TESI

In questa tesi sono stati valutati gli effetti di tre differenti Bisfenoli, ovvero Bisfenolo AF, F, S e di una loro miscela su parametri biochimici della microalga *Phaeodactylum tricornutum* (K. Bohlin, 1897). La valutazione dell'attività degli enzimi coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e il grado di danno ossidativo, sono importanti marcatori per comprendere come le cellule rispondono ai contaminanti testati, e per valutare quindi la tossicità degli stessi su organismi vegetali.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Organismo modello

*Phaeodactylum tricornutum* (K. Bohlin, 1897) è attualmente classificata come segue:

<b>Phylum</b>	Bacillariophyta
<b>Classe</b>	Bacillariophyta
<b>Ordine</b>	Bacillariales Hendey, 1937
<b>Famiglia</b>	Phaeodactylaceae (nov.fam).
<b>Genere</b>	Phaeodactylum (Bohlin, 1897)
<b>Specie</b>	<i>P. tricornutum</i>

(AlgaeBase, consulted on October 19th, 2022)

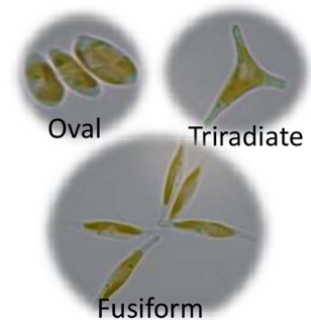


Fig. 5: i tre morfotipi di *Phaeodactylum* (Villanova et al., 2016).

Si tratta di un'alga unicellulare marina reperibile in 3 morfotipi differenti: ovale, fusiforme e triradiata (Fig. 5), che si alternano in base alle condizioni ambientali. Contrariamente alla maggior parte delle diatomee, *P. tricornutum* non produce un guscio siliceo, favorendo il suo impiego come organismo modello. La principale motivazione che ha portato alla scelta di utilizzare la microalga risiede innanzitutto nel fatto che gli studi riguardanti gli effetti degli analoghi del bisfenolo A si concentrano su organismi animali, trascurando in maniera importante il regno vegetale. In modo particolare, nel caso di *P. tricornutum*, si tratta di un organismo modello che ben rappresenta la base della catena trofica marina e che può essere mantenuto facilmente in condizioni di laboratorio.

#### 3.2 Stabulazione ed esposizione

*P. tricornutum* è stato inizialmente mantenuto nel medium di coltura F/2 (Guillard 1995) in assenza di contaminanti per una settimana, alla temperatura 16°C e impostando un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio con un'irradianza di 40,5  $\mu\text{mol}$  di fotoni/ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ .

In seguito alla stabulazione, sono state testate 6 condizioni sperimentali in triplicato, utilizzando in totale 18 beute, ognuna contenente 200 mL di F/2. Nello specifico sono stati testati i tre diversi bisfenoli (AF, F ed S) ad una concentrazione di 300 ng/L oltre alla loro miscela composta da 100 ng/L ciascuno. In aggiunta, poiché le soluzioni madre dei bisfenoli AF ed F sono state preparate in metanolo, contrariamente ad S che è stato diluito in acqua distillata, si è scelto di effettuare

un controllo con il solvente (300 ng/L di metanolo) in aggiunta al controllo con solo medium di coltura.

Le colture sono state avviate ad una concentrazione iniziale di  $5 \times 10^4$  cellule/mL e mantenuta fino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita, per essere interrotta per il prelievo dei campioni. Il medesimo set-up è stato ricostituito per raggiungere la fase esponenziale e ripetere il campionamento.

Durante le due esposizioni, rispettivamente fino a 9 e 5 giorni, le 18 beute sono state mantenute nelle condizioni iniziali di luce e temperatura. Durante entrambe le esposizioni è stata misurata quotidianamente la concentrazione algale, il volume e diametro medio cellulare in ciascuna beuta, utilizzando un contatore di particelle Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter, Millipore (i dati relativi a queste analisi sono in fase di elaborazione).

### 3.3 Omogeneizzazione dei campioni

In preparazione a tutte le analisi, i singoli campioni sono stati sottoposti a sonicazione per 1 min al 50% di ampiezza (Bandelin Sonoplus), dopo l'aggiunta del tampone di omogeneizzazione.

### 3.4 Capacità antiossidante totale (CUPRAC)

Il saggio CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) è un metodo che consente la misurazione della capacità antiossidante totale (TAC) di un campione. Il principale reagente, il rame, viene ridotto dagli antiossidanti presenti nel campione per subire poi chelazione da parte della neocuproina, la quale consente una reazione più rapida elevando il potenziale redox del reagente.

La capacità antiossidante è stata misurata tramite un saggio spettrofotometrico proposto da Apak et al. (2004), che prevede la lettura dei campioni (50 $\mu$ L di rame cloruro + 50 $\mu$ L di tampone acetato + 50 $\mu$ L di neocuproina + 30 $\mu$ L di supernatante) ad una lunghezza d'onda di 450nm. I risultati sono stati espressi come equivalenti di Trolox (analogo della vitamina E) /mg di proteine.

### 3.5 Attività dell'enzima superossido dismutasi (SOD)

La SOD è un enzima antiossidante che catalizza la dismutazione di una molecola di anione superossido ( $O_2^-$ ) in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e ossigeno molecolare ( $O_2$ ). L'attività di questo enzima è stata misurata registrando la variazione di assorbanza per 1 minuto di campioni (contenenti 930 $\mu$ L tampone fosfato + 20 $\mu$ L ipoxantina + 10 $\mu$ L citocromo c + 30 $\mu$ L supernatante + 10 $\mu$ L xantina ossidasi) ad una lunghezza d'onda di 550nm. L'attività totale è espressa U SOD/ mg proteine.

### 3.6 Attività della catalasi (CAT)

La CAT è una proteina tetramerică che agisce come enzima antiossidante in tutti i tessuti, in cui catalizza la degradazione del perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in acqua e ossigeno molecolare. La sua attività è stata misurata come variazione di assorbanza a 240nm per 30 secondi per campione (970μL tampone fosfato + 30μL supernatante). I risultati sono stati espressi come U CAT/ mg proteine.

### 3.7 Attività della glutazione reduttasi (GR)

La GR è una flavoproteina omodimerica che catalizza la conversione del glutazione bisolfuro (GSSG) nella sua forma ridotta GSH in presenza di NADPH (Fig. 6), permettendo il mantenimento di un elevato rapporto tra la concentrazione di GSH e GSSG.



Fig. 6: Reazione enzimatica catalizzata dalla GR.

Il metodo usato in questa analisi è quello proposto da Smith et al. (1998), in cui il GSH originato dalla reazione sopra citata reagisce spontaneamente con DTNB (5,5'-dithiobis (2-ittrobenzoic acid)) dando origine a TNB (5-thio (2-nitrobenzoic acid)). Il TNB viene rilevato grazie ad un incremento di assorbanza osservato a 412 nm, e sarà direttamente proporzionale all'attività della glutazione reduttasi. I risultati sono stati espressi in U GR/mg proteine.

### 3.8 Attività della glutazione perossidasi (GPX)

La GPX è un enzima intracellulare che catalizza la riduzione di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in acqua. Durante la reazione il glutazione (GSH), forma ridotta del GSSG, agisce da donatore di e<sup>-</sup> e una volta ossidato viene rigenerato dalla glutazione reduttasi (GR) in presenza di NADPH (Fig. 7).



Fig. 7: reazione enzimatica catalizzata dalla GPX e dalla GR

Il saggio è stato compiuto tramite l'osservazione allo spettrofotometro del decremento di assorbanza dei diversi campioni (500μL campione + 100μL acqua distillata + 50μL GSH + 50μL sodio azide + 50μL GR + 100μL supernatante) misurata

per 1 minuto a 340 nm, con un intervallo di lettura di 10s. I risultati sono espressi in nmol/min/mg proteine.

### 3.9 Attività della glutatione S-transferasi (GST)

Le glutatione S-transferasi sono una famiglia di isoenzimi detossificanti citosolici e microsomiali che catalizzano la coniugazione di varie molecole tossiche con la forma ridotta del glutatione (GSH), rendendole meno reattive e più facilmente eliminabili dall'organismo. Durante l'analisi allo spettrofotometro di campioni contenenti CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzene), tampone fosfato, supernatante e GSH a 340nm, si osserva un aumento di assorbanza nel primo minuto. I risultati sono espressi come nmol/min/mg proteine.

### 3.10 Attività di ascorbato perossidasi (APX)

L'ascorbato perossidasi è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi presente nei cloroplasti, nel vacuolo e nel citosol. APX catalizza la riduzione dell'acqua ossigenata utilizzando l'ascorbato come substrato (Fig. 8).



Fig. 8: reazione enzimatica catalizzata dall'ascorbato perossidasi

La sua attività è stata valutata calcolando il consumo di acido ascorbico, secondo la metodica proposta da Nakano e Asada (1981) e modificata da Janknegt et al., 2009. I risultati sono espressi in U APX/mg proteine.

### 3.11 Perossidazione lipidica (LPO)

La perossidazione dei lipidi di membrana è stata stimata attraverso la formazione di sostanze reattive all'acido tio-barbutirico (TBARS), quindi tramite l'analisi spettrofotometrica di campioni di supernatante, acido cloridrico 0.6M e TRIS-TBA (tetrabutilammonio). Dalla lettura dell'assorbanza a 532 nm sono stati ricavati i valori di concentrazione di MDA (prototipo di TBARS) su mg di proteine. I risultati sono stati espressi come nmol TBARS/mg proteine.

### 3.12 Contenuto carbonilico nelle proteine (PCC)

La misura dei livelli di PCC è un buon biomarker per la valutazione del danno ossidativo a carico delle proteine, in cui viene misurata la concentrazione di gruppi carbonile. In particolare, è stata misurata tramite lettura allo spettrofotometro dell'assorbanza a 370nm, facendo reagire il campione prima con 2,4-

dinitrofenilidrazina (DNPH) e poi con guanidina. I risultati sono stati espressi in nmol/ mg proteine.

### 3.13 Proteine totali per campione (Bradford)

Per normalizzare tutti i valori derivati dalle analisi biochimiche è stata misurata la quantità di proteine totali per ogni campione utilizzando il metodo proposto da Bradford (1976).

### 3.14 Analisi statistica

Sui dati ottenuti è stata eseguita un'analisi della varianza a due vie (ANOVA), seguita da un test post-hoc (Fisher LSD) per i confronti a coppie. Il software utilizzato per l'analisi statistica è stato OriginPro 2022. I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard (n=3).

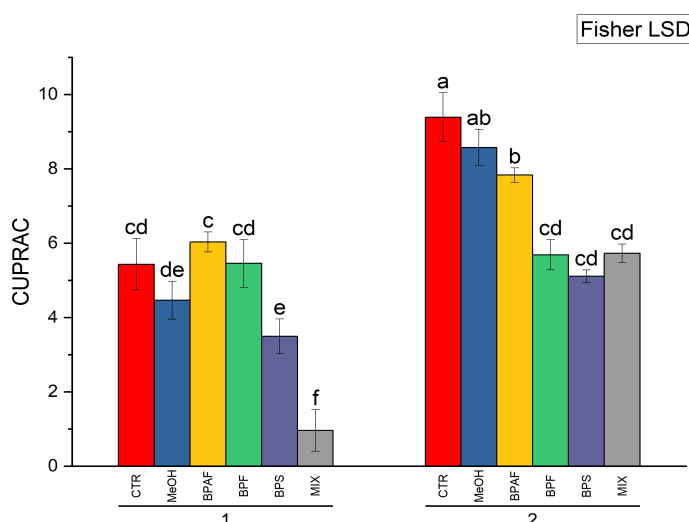
## 4. RISULTATI

### 4.1 CUPRAC

Il test ANOVA a due vie ha mostrato un effetto statisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) dei fattori “tempo”, “trattamento” e dell’interazione dei due fattori sui valori di CUPRAC (Tab. 1). Inoltre, il test post hoc ha evidenziato che in fase esponenziale (indicato in grafico come tempo 1) il BPS ha causato un calo nel livello di CUPRAC rispetto al controllo, ma non rispetto al controllo con metanolo. In aggiunta, la miscela (MIX) ha causato una diminuzione significativa della capacità antiossidante totale rispetto ad entrambi i controlli. Al contrario, nella fase stazionaria (tempo 2) i valori della capacità antiossidante totale sono significativamente più bassi nelle microalghe esposte a BPAF rispetto al solo controllo, mentre BPF, BPS E MIX hanno causato un calo significativo rispetto ad entrambi i controlli (Fig. 9).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	67,86106	67,86106	99,66145	5,08E-10
Trattamento	5	75,79944	15,15989	22,26397	2,69E-08
Interaction	5	23,90462	4,78092	7,02131	3,60E-04
Model	11	167,56512	15,23319	22,37162	5,63E-10
Error	24	16,34198	0,68092		
Corrected Total	35	183,9071			

Tab. 1: ANOVA a due vie per CUPRAC



Significance Level: 0,05

Fig. 9: valori di CUPRAC espressi in mM equivalenti di Trolox/mg proteine. I valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard. Lettere non condivise indicano differenze significative tra i campioni della stessa fase di esposizione.

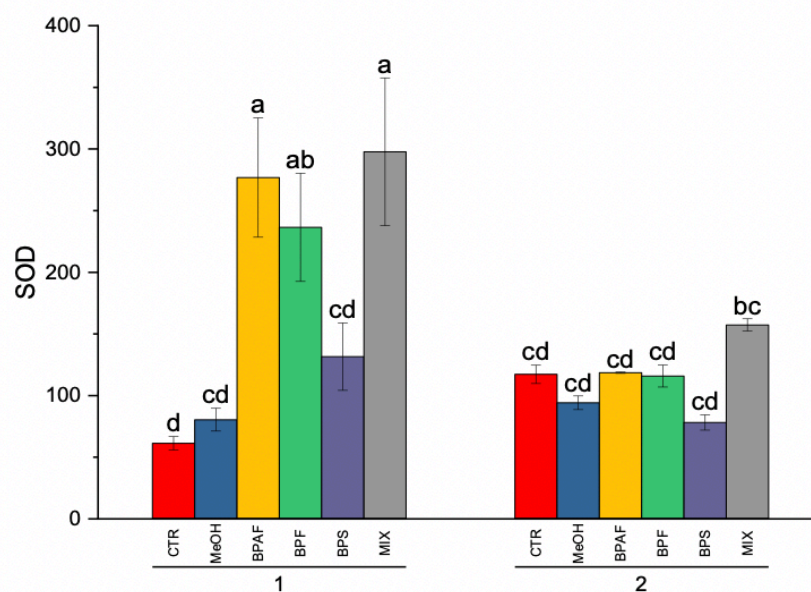


## 4.2 Attività della SOD

L'analisi ANOVA ha evidenziato un effetto significativo ( $p < 0.05$ ) delle variabili "tempo", "trattamento" e della loro interazione sull'attività della SOD (Tab. 2). In particolare, si osserva un aumento statisticamente significativo dell'attività nei campioni esposti a BPAF, BPF, e MIX rispetto sia al controllo che al controllo con solvente dopo 5 giorni. Viceversa, nessuna variazione è stata osservata dopo l'esposizione di 9 giorni (Fig. 10).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	40616,031	40616,031	18,15843	2,72E-04
Trattamento	5	111446,16	22289,232	9,96497	2,96E-05
Interaction	5	57640,881	11528,176	5,15396	0,00237
Model	11	209703,07	19063,916	8,52301	6,89E-06
Error	24	53682,229	2236,7595		
Corrected Total	35	263385,3			

Tab. 2: ANOVA a due vie per SOD



Significance Level: 0,05

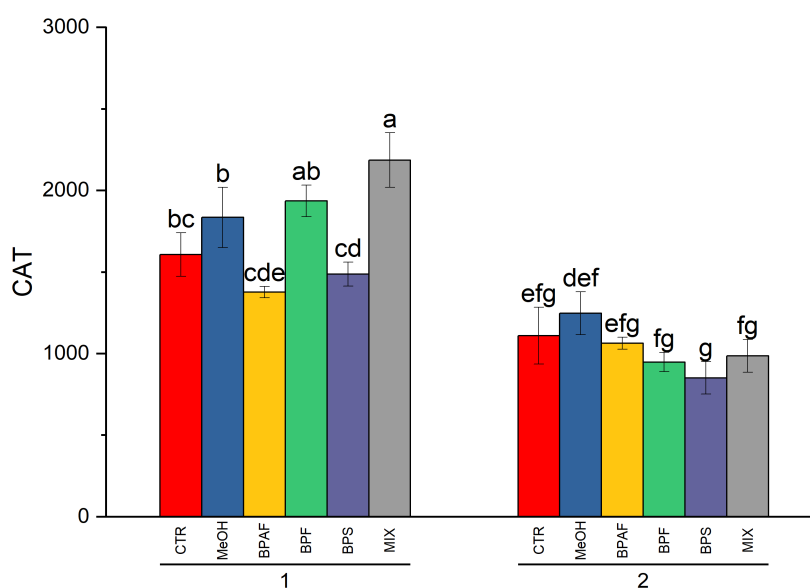
Fig. 10: attività della SOD espressa come U SOD/ mg proteine. I valori sono rappresentati come media  $\pm$  errore standard. Lettere non condivise indicano differenze significative tra i campioni della stessa fase di esposizione.

### 4.3 Attività della CAT

Anche per la CAT, il test ANOVA ha evidenziato un effetto significativo delle variabili “tempo”, “trattamento” e dell’interazione tra le due (Tab. 3), in questo caso però nel test post-hoc si osserva un aumento statisticamente significativo dell’attività enzimatica solo per il campione esposto a MIX fino alla fase esponenziale (1) (Fig. 11).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	4457588,9	4457588,9	105,86848	2,81E-10
Trattamento	5	857069,6	171413,92	4,07111	0,00811
Interaction	5	810170,39	162034,08	3,84834	0,01058
Model	11	6124828,9	556802,63	13,22415	1,18E-07
Error	24	1010519,3	42104,969		
Corrected Total	35	7135348,2			

Tab. 3: ANOVA a due vie per CAT



Significance Level: 0,05

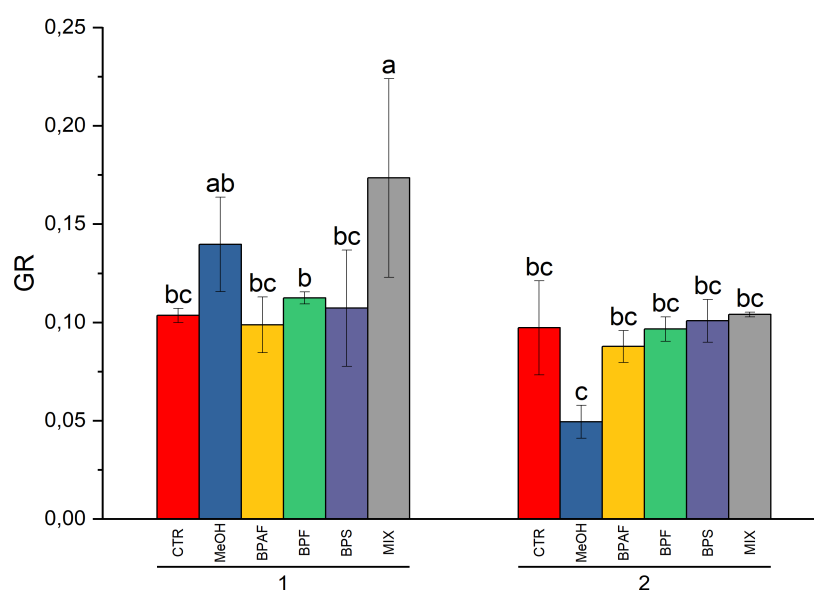
Fig. 11: attività della CAT espressa in U CAT/ mg proteine. I valori sono rappresentati come media  $\pm$  errore standard. Lettere non condivise indicano differenze significative tra i campioni della stessa fase di esposizione.

#### 4.4 Attività di GR

Nel caso dell'enzima glutatione reduttasi, il test ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore "tempo" (Tab. 4). Come deducibile dalla figura 12, solamente il campione esposto a MIX per 5 giorni ha subito un aumento di attività significativo rispetto al controllo con solo medium di coltura.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	0,00993	0,00993	7,79988	0,0101
Trattamento	5	0,00841	0,00168	1,32106	0,28874
Interaction	5	0,01022	0,00204	1,6051	0,19683
Model	11	0,02857	0,0026	2,03915	0,07005
Error	24	0,03057	0,00127		
Corrected Total	35	0,05914			

Tab. 4: ANOVA a due vie per GR.



Significance Level: 0,05

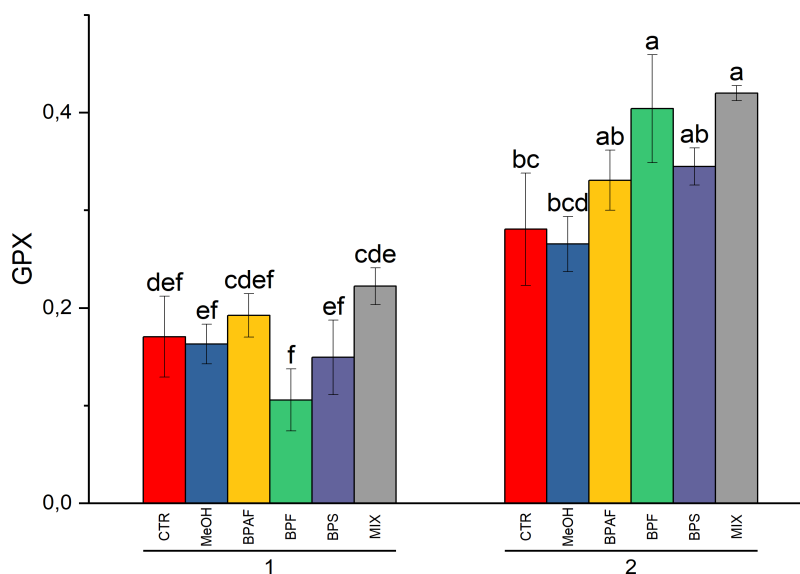
Fig. 12: attività della GR espressa in U GR/ mg proteine. I valori sono rappresentati come media  $\pm$  errore standard. Lettere non condivise indicano differenze significative tra i campioni della stessa fase di esposizione.

## 4.5 Attività di GPX

L'analisi statistica ANOVA a due vie sui valori dell'attività dell'enzima glutatione perossidasi ha evidenziato un effetto significativo di tutti i fattori: "tempo", "trattamento" e interazione tra i due (Tab. 5). Più nel dettaglio, la figura 13 mostra come i campioni esposti a BPF e MIX per 9 giorni abbiano riportato un significativo aumento di attività rispetto ai due controlli.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	0,2718	0,2718	77,71757	5,43E-09
Trattamento	5	0,04198	0,0084	2,40104	0,06695
Interaction	5	0,04046	0,00809	2,31371	0,07526
Model	11	0,35424	0,0322	9,2083	3,48E-06
Error	24	0,08393	0,0035		
Corrected Total	35	0,43817			

Tab. 5: ANOVA a due vie per GPX



Significance Level: 0,05

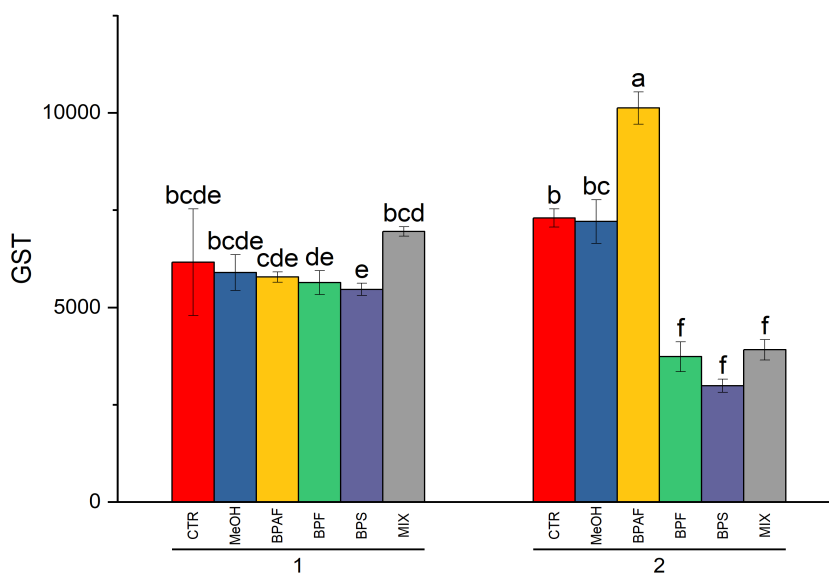
Fig. 13: attività della GPX espressi in nmol/min/ mg proteine. I valori sono rappresentati come media  $\pm$  errore standard. Lettere non condivise indicano differenze significative tra i campioni della stessa fase di esposizione.

#### 4.6 Attività di GST

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto significativo ( $p < 0.05$ ) dei fattori "trattamento" ed "interazione tra tempo e trattamento" (Tab. 6). Dal test post-hoc, invece, sono emerse diverse risposte ai fattori appena citati: durante la fase esponenziale (1) nessun composto ha influenzato in modo significativo l'attività, al contrario della fase stazionaria (2) in cui tutti e 3 i contaminanti (BPAF, BPF, BPS) hanno causato significative differenze di attività rispetto ai controlli. Nello specifico il BPAF ha causato un incremento significativo, mentre BPF, BPS e MIX hanno causato una riduzione significativa dell'attività dell'enzima (Fig. 14).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	100675,67	100675,67	0,13332	0,71821
Trattamento	5	5,91E+07	1,18E+07	15,64025	7,07E-07
Interaction	5	6,13E+07	1,23E+07	16,22454	5,10E-07
Model	11	1,20E+08	1,09E+07	14,49612	4,81E-08
Error	24	1,81E+07	755127,75		
Corrected Total	35	1,39E+08			

Tab. 6: ANOVA a due vie per GST



Significance Level: 0,05

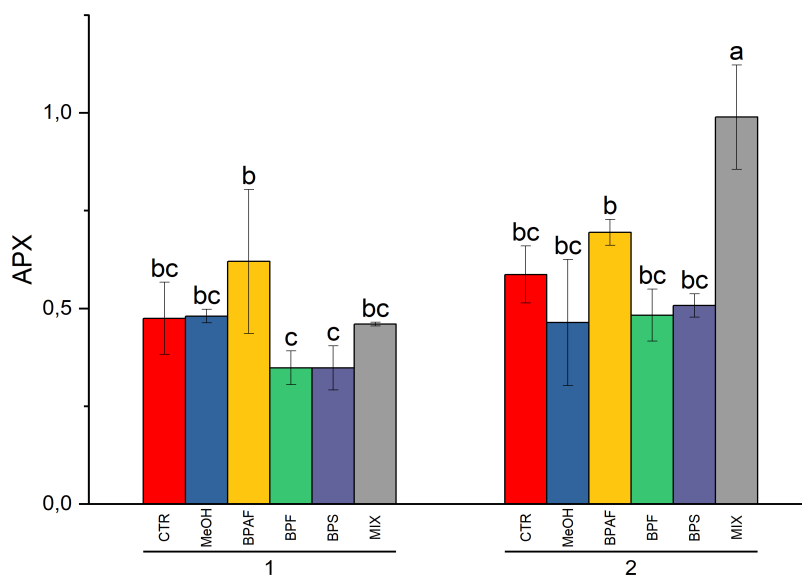
Fig. 14: attività della GST espressa in nmol/ min/ mg proteine. I valori sono rappresentati come media  $\pm$  errore standard. Lettere non condivise indicano differenze significative tra i campioni della stessa fase di esposizione.

#### 4.7 Attività di APX

Sia il “tempo” che il “trattamento” hanno avuto un effetto significativo sull’attività dell’enzima APX (Tab. 7). Il test post hoc ha in aggiunta indicato un effetto significativo della miscela di bisfenoli, con un aumento dell’attività enzimatica dopo 9 giorni di esposizione rispetto ai controlli (Fig. 15).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	0,24679	0,24679	9,54206	0,00502
Trattamento	5	0,48366	0,09673	3,74008	0,01206
Interaction	5	0,26686	0,05337	2,06356	0,1055
Model	11	0,99731	0,09066	3,50548	0,00493
Error	24	0,62073	0,02586		
Corrected Total	35	1,61803			

Tab. 7: ANOVA a due vie per APX



Significance Level: 0,05

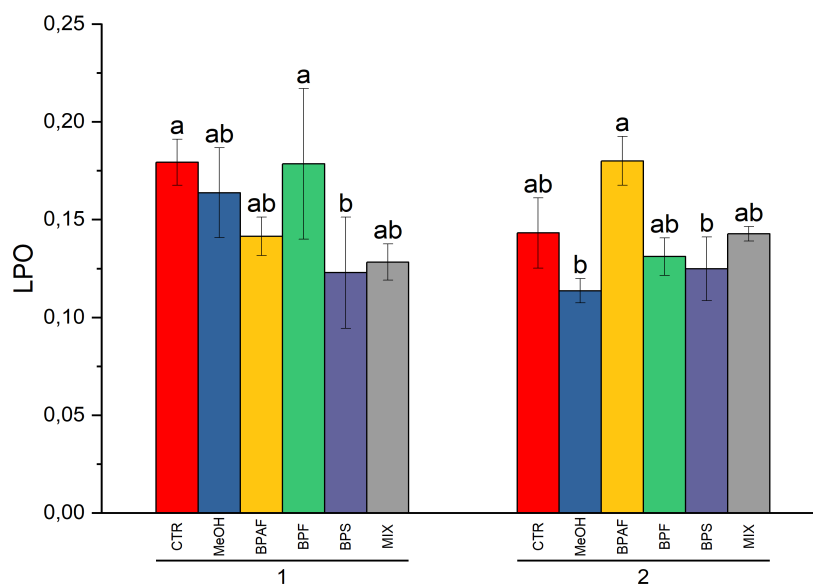
Fig. 15: attività della APX espressa in U APX/mg proteine. I valori sono rappresentati come media  $\pm$  errore standard. Lettere non condivise indicano differenze significative tra i campioni della stessa fase di esposizione.

## 4.8 LPO

Il test ANOVA a due vie e il successivo confronto a coppie non hanno evidenziato alcuna variazione statisticamente significativa tra il controllo e i diversi trattamenti (Tab. 8 e Fig. 16).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	0,00155	0,00155	1,54145	0,2264
Trattamento	5	0,00708	0,00142	1,40571	0,25778
Interaction	5	0,01012	0,00202	2,00846	0,11369
Model	11	0,01876	0,00171	1,69203	0,13603
Error	24	0,02419	0,00101		
Corrected Total	35	0,04295			

Tab. 8: ANOVA a due vie per LPO



Significance Level: 0,05

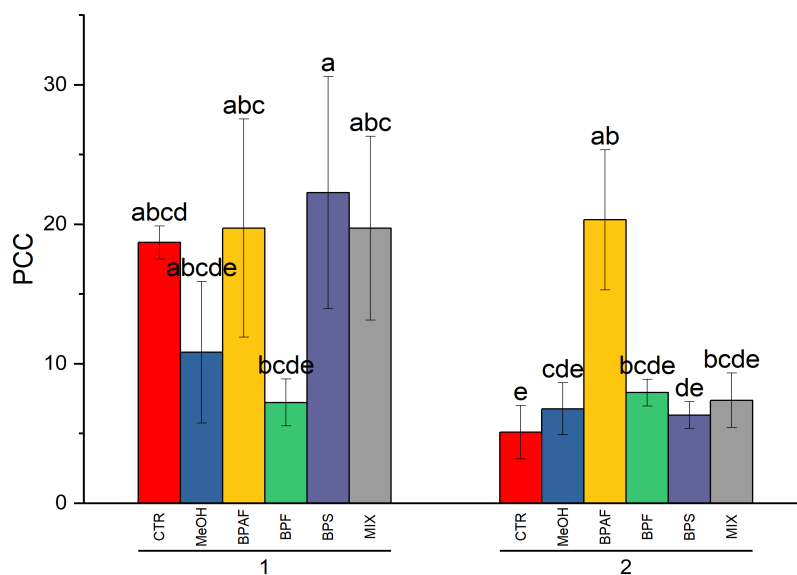
Fig. 16: valori di LPO espressi come nmol TBARS/mg proteine. I valori sono rappresentati come media  $\pm$  errore standard. Lettere non condivise indicano differenze significative tra i campioni della stessa fase di esposizione.

## 4.9 PCC

Solo il fattore “tempo” ha manifestato un effetto significativo sui livelli dei gruppi carbonilici delle proteine (Tab. 9 e Fig. 17).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	498,14784	498,14784	8,23471	0,00844
Trattamento	5	594,51878	118,90376	1,96556	0,12051
Interaction	5	414,93222	82,98644	1,37182	0,26978
Model	11	1507,5988	137,05444	2,2656	0,04555
Error	24	1451,8483	60,49368		
Corrected Total	35	2959,4471			

Tab. 9: ANOVA a due vie per PCC



Significance Level: 0,05

Fig. 17: valori di PCC espressi in nmol/mg proteine. I valori sono rappresentati come media  $\pm$  errore standard. Lettere non condivise indicano differenze significative i campioni della stessa fase di esposizione.



## 5. DISCUSSIONE

Nonostante il recente impiego dei bisfenoli analoghi del BPA vi è una generale scarsità di informazioni riguardanti la loro pericolosità ed in modo particolare riguardo all'effetto nocivo che queste sostanze possono avere su organismi ed ecosistemi marini. A questo scopo sono stati valutati gli effetti indotti da tre principali analoghi del BPA (BPAF, BPF e BPS) sulla diatomea *P. tricornutum*. Nello specifico sono stati analizzati molteplici parametri biochimici quali: la capacità antiossidante totale, l'attività di diversi enzimi antiossidanti e i livelli di danno ossidativo a carico delle macromolecole.

I composti SOD e CAT agiscono come prima linea di difesa contro lo stress ossidativo (Mittler, 2002), dalle Fig. 10 e 11 si evince che durante la fase esponenziale BPAF, BPF E MIX hanno indotto un aumento statisticamente significativo dell'attività di SOD, mentre solo l'esposizione a 5 giorni di miscela (MIX) ha indotto nella microalga un aumento dell'attività enzimatica di CAT. In un recente studio condotto su *Chlorella pyrenoidosa* è stato indagato l'effetto dell'esposizione per 6 giorni a BPS, BPA a 15, 20, e 40 mg/L e la loro miscela (1:1), riportando ripercussioni nell'efficienza antiossidante della microalga causate anche da BPS (Li et al., 2022). È stato notato che il picco di attività SOD misurato tra i campioni esposti a BPS (44.08 U/mg proteine) era di 3.5 volte maggiore rispetto al valore di controllo, mentre il picco di attività SOD misurato nei campioni esposti a BPA (31.46 U/mg proteine) è risultato essere 2.4 volte il valore del campione di controllo. A livello generale, è stato inoltre registrato un rapido aumento dei livelli di ROS e della perossidazione lipidica, dato che conferma un'inibizione del sistema antiossidante (Li et al., 2022). Non sono invece presenti in letteratura studi che abbiano indagato l'effetto del BPAF e del BPF sull'attività antiossidante di SOD e CAT in microalghe.

Tuttavia, in uno studio compiuto sull'alga verde *Chlorella vulgaris* esposta a BPA e Fluorene-9-bisfenolo (BHPF), un ulteriore analogo di recente introduzione, a concentrazioni di 0.1, 0.5, 1, 5, 10 e 20 mg/L per un tempo fino a 168 ore totali, si è osservata una differente risposta alle alte concentrazioni di analoghi del bisfenolo A. In particolare, dopo 72 ore di esposizione a BHPF, è stato osservato un decremento significativo nell'attività dell'enzima SOD, mentre l'attività di CAT è rimasta invariata rispetto al controllo, suggerendo che il perossido di idrogeno prodotto dalle reazioni catalizzate da SOD era stato efficientemente convertito in acqua dalla catalasi (Zhang et al., 2021).

È opportuno notare come gli effetti osservati su CAT e SOD nei due studi appena citati, risultato di un'esposizione ad elevate concentrazioni di bisfenoli,

si siano verificati anche nello studio su *P. tricornutum* qui proposto, nonostante le concentrazioni notevolmente minori. Il sistema antiossidante degli organismi vegetali unicellulari, quindi, risulta sensibile anche a una concentrazione dell'ordine dei ng/L dei tre contaminanti testati.

I risultati sulle attività di SOD e CAT in seguito ad esposizione a bisfenoli sono simili a quelli riscontrati anche in studi in cui le microalghe sono state esposte a erbicidi. Infatti, nella microalga *Chlorella vulgaris*; le attività dei due enzimi antiossidanti sono state incrementate anche da basse concentrazioni di florasulam, un erbicida efficace contro le piante infestanti a foglia larga ampiamente utilizzato nelle colture di grano (Jiao et al., 2022). Le concentrazioni di 2 e 6 mg/L di contaminante testato a 0, 24, 48, 72 e 96 ore dopo il trattamento hanno provocato una sovraregolazione tempo e concentrazione dipendente degli enzimi antiossidanti. Infatti, è stato riportato un aumento di attività proporzionale al tempo di esposizione sia di CAT che di SOD, con un picco di attività a 96 ore nel campione contenente 6 mg/L di florasulam come in quello contenente 2 mg/L. La prova dell'elevato danno ossidativo subito dall'alga, nonostante le alte attività di SOD e CAT, risiede nel significativo accumulo di MDA, il prodotto della perossidazione lipidica, nei campioni trattati. Allo stesso tempo sono state rilevate anche alte concentrazioni di ROS (Jiao et al., 2022).

Anche l'esposizione a basse dosi di ritardanti di fiamma si è visto provocare in *Phaeodactylum tricornutum* un simile effetto sul sistema antiossidante. Da uno studio compiuto da Liu et al. (2019) sulla tossicità del tributilfosfato (TBP), infatti, si osserva che in *P. tricornutum*, a fronte di concentrazioni di 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 e 1.6 mg/L di TBP, l'attività di SOD subisce un aumento significativo dopo 24 ore di esposizione, con un picco a 1.2 mg/L, per poi decrescere lentamente con il proseguire del tempo di esposizione. L'attività CAT segue un andamento molto simile, mostrando però un picco di attività a 1.6 mg/L. Anche in questo caso vi è corrispondenza tra le concentrazioni a cui si verificano elevate attività degli enzimi superossido dismutasi e catalasi e gli aumenti significativi di ROS e MDA (Liu et al., 2019).

La decrescita dell'attività enzimatica antiossidante, osservata ad esposizione prolungata, può indicare che l'attivazione del meccanismo antiossidante in risposta alla contaminazione iniziale può perdere di efficacia nel caso di una contaminazione persistente (Gonçalves et al., 2021).

Nel presente studio su *P. tricornutum* è stata analizzata anche l'attività degli enzimi coinvolti nel ciclo del glutatione (GR, GPX, GST), importante per il ruolo centrale che svolge nella rimozione di ROS e la generazione di molecole meno

tossiche ed idrofiliche che possono quindi essere escrete più facilmente. L'analisi dei vari componenti del ciclo della glutazione della microalga *P. tricornutum* ha mostrato delle alterazioni: l'attività dell'enzima GR ha subito un incremento significativo nel campione esposto alla miscela (MIX) per la durata della fase esponenziale (Fig. 12), mentre l'enzima GPX ha subito un aumento nella fase stazionaria, significativo in MIX e BPF (Fig. 13).

L'attività di GST, per contro, è stata significativamente influenzata da tutti e 3 i contaminanti (BPAF, BPF, BPS) durante la fase stazionaria: BPAF ha causato un incremento, mentre BPF, BPS e MIX un decremento dell'attività (Fig. 14).

Tuttavia, la scarsità di studi compiuti sull'effetto di analoghi del bisfenolo A su organismi vegetali e in particolare sugli effetti subiti dal ciclo di GSH non rende possibile un'esauriva analisi comparativa con altri studi, ragione per cui sarà necessario confrontare i dati osservati con gli effetti registrati in studi che indagano la tossicità di altri contaminanti.

A tal proposito, come per i bisfenoli da noi indagati, anche il tris (1,3-dicloro-2propil) fosfato (TDCPP), un composto ampiamente utilizzato come plasticizzante e ritardante di fiamma, induce in *Pheodactylum tricornutum* un incremento dell'attività degli enzimi glutazione reduttasi e glutazione perossidasi. Sull'alga esposta a 4 mg/L per 24 ore, infatti, è stato rilevato un significativo aumento dell'attività sia di GR che di GPX, con valori di rispettivamente 1.31 e 1.20 volte quello di controllo (Liu et al. 2020).

Si è notato che anche dal fungicida Folpet, un composto organico derivato da ftalimide e triclorometilsolfonile molto usato in viticoltura, induce un aumento nell'attività di GR e GST (Teisseire et al. 2001) in *Lemna minor*. Un'esposizione ad una concentrazione pari a 33  $\mu$ M di fungicida, infatti, ha indotto in *L. minor* un forte incremento dell'attività di GR, significativo tra le 24 e le 96 ore di esposizione, mentre solamente 6 ore sono bastate per causare un aumento del 38% dell'attività di GST rispetto al controllo (Teisseire et al. 2001).

Un altro importante biomarcatore analizzato in questo studio è stata l'attività dell'enzima ascorbato perossidasi (APX), il quale rappresenta un'ulteriore componente del meccanismo difensivo della cellula contro le ROS ed in particolare contro il perossido di idrogeno. In questo studio si è osservato un effetto significativo della miscela di bisfenoli (MIX) sull'attività di APX dopo 9 giorni di esposizione (Fig. 15) e, come gli enzimi GR e GST, anche l'attività di APX è stata significativamente incrementata dopo 24 ore di esposizione al fungicida Folpet (Teisseire et al. 2001).

In maniera similare, in uno studio ecotossicologico applicato al nano pesticida Pendimetalin, un'erbicida derivante della dinitroanilina utilizzato contro le graminacee, si è analizzato l'effetto nocivo sull'alga *Chlorella vulgaris*.

Ciò che è emerso è che la specie ha risposto a tutti i trattamenti con un aumento significativo dell'attività di APX.

Riguardo invece al danno ossidativo, nel presente lavoro sono stati misurati il danno ossidativo a carico delle proteine e quello a carico dei lipidi. LPO e PCC sono i bioindicatori più utilizzati in quanto riportano rispettivamente il livello di perossidazione lipidica e il contenuto carbonilico nelle proteine, entrambe importanti risposte cellulari di danno ossidativo. Nel caso di *P. tricornutum* l'esposizione non ha portato ad una significativa variazione nelle concentrazioni di MDA e PCC nei campioni testati rispetto al controllo.

In uno studio compiuto su *Navicula sp* e *Chlorella vulgaris* esposte a 0, 1, 5, 10, 20, 50 e 100 mg/L di BPS per un totale di 120 ore, è stata però notata una risposta differente dei due organismi all'esposizione con il contaminante. In *C. vulgaris* l'attività di SOD e CAT è aumentata all'aumentare della concentrazione di BPS a partire da 20 mg/L, ad indicare che il meccanismo di detossificazione messo in atto da *C. vulgaris* è correlato alla specifica concentrazione, per contrastare l'accumulo di ROS. È interessante notare come anche la perossidazione lipidica, espressa in contenuto di MDA, fosse anch'essa significativamente aumentata dall'esposizione a 20 mg/L di BPS.

I bisfenoli possono essere continuamente rilasciati e adsorbiti dalle microplastiche (Fabrello et al, 2022), che sono quindi uno dei mezzi tramite cui avviene la contaminazione dell'ambiente acquatico. In uno studio sulla tossicità singola e combinata di microplastiche e nonilfenolo (NP), un composto organico di sintesi utilizzato come tensioattivo, ha evidenziato in *Chlorella pyrenoidosa* un effetto positivo su MDA. Il contenuto di malondialdeide è stato rilevato in quantità significativamente maggiori in campioni esposti per 96 ore a 50 mg/L di tutte le microplastiche testate singolarmente, indicando un parallelo aumento di ROS dopo il tempo indicato. Allo stesso modo, 2 mg/L di nonilfenolo hanno indotto un significativo aumento di concentrazione di MDA dopo 96 ore di esposizione. È curioso notare come il contenuto di MDA in risposta al trattamento combinato dei due contaminanti sia stato rilevato in concentrazione minore rispetto a quello misurato nel campione esposto a NP ma comunque significativamente maggiore al valore di controllo, suggerendo che la presenza di microplastiche possa aver limitato lo stress ossidativo esercitato da NP (Yang et al., 2020).

Nello stesso studio è stato analizzato l'effetto di BPS sul tasso di crescita dei due organismi, da cui si deduce la stretta correlazione tra la concentrazione e

il tempo di esposizione BPS e la tossicità registrata. La crescita di *Navicula sp*, infatti, appare inibita da alte concentrazioni di BPS, così come quella di *C. vulgaris*, seppure quest'ultima risulti momentaneamente stimolata dalla concentrazione di 1 mg/L (Li et al., 2021). Allo stesso modo, anche il tasso di crescita della macrofita *Hydrilla verticillata* è stato significativamente influenzato da 10 mg/L di BPF, oltre che da 10 mg/L di PS-NPs, nanoplastica di polistirene (Yu et al., 2022). Anche lo studio di Elerseck et al. (2020) evidenzia un effetto significativo di concentrazione maggiori di 9,4 mg/L di BPF sul tasso di crescita dell'alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* e nel cianobatterio *Synechococcus leopoliensis*. Avendo testato lo stesso effetto con l'esposizione a BPA, gli autori concludono che il potenziale tossico di BPA e BPF, sugli organismi sopra citati, è comparabile.

## 6. CONCLUSIONE

In merito ad alcuni parametri biochimici esaminati in questo studio sono state riscontrate variazioni statisticamente significative che suggeriscono un potenziale rischio ecotossicologico dei bisfenoli AF, F ed S e della miscela dei tre sulla microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Questi risultati rappresentano un'aggiunta alle conoscenze attuali riguardanti la tossicità degli emergenti analoghi del bisfenolo A sopra citati, la cui diffusione in ambiente è destinata ad aumentare a causa dell'aumentata produzione. Per questo motivo lo studio non è sufficiente nell'individuare tutti i potenziali effetti a cui sono sottoposti gli organismi ed è di fondamentale importanza un approfondimento mirato. In conclusione, quindi, sono necessari un maggiore numero di studi per implementare la conoscenza di questi contaminanti e poterne limitare la disponibilità ambientale.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Almeida, S., Raposo, A., Almeida-González, M., & Carrascosa, C. (2018). Bisphenol A: Food exposure and impact on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*, 1503-1517.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*, 7970-7981.
- Aris, A. (2014). Estimation of bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada. *Reproductive Toxicology*, *45*, 8-13.
- Audebert, M., Dolo, L., Perdu, E., Cravedi, J. P., & Zalko, D. (2011). Use of the  $\gamma$ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Archives of toxicology*, *85*, 1463-1473.
- Björnsdotter, M. K., de Boer, J., & Ballesteros-Gómez, A. (2017). Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere*, *182*, 691-706.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*, 248-254.
- Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M., & Chagnon, M. C. (2009). Genotoxic and endocrine activities of bis (hydroxyphenyl) methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology*, *255*, 15-24.
- Catenza, C. J., Farooq, A., Shubear, N. S., & Donkor, K. K. (2021). A targeted review on fate, occurrence, risk and health implications of bisphenol analogues. *Chemosphere*, *268*, 129273.
- Danzl, E., Sei, K., Soda, S., Ike, M., & Fujita, M. (2009). Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. *International journal of environmental research and public health*, *6*, 1472-1484.

- Degen, G. H., & Bolt, H. M. (2000). Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *International archives of occupational and environmental health*, 73, 433-441.
- ECHA. Assessment of Regulatory Needs. Version 1.0, 16 December 2021. Available online: [https://echa.europa.eu/documents/10162/3448017/GMT\\_109\\_Bisphenols\\_Report\\_public\\_23502\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/3448017/GMT_109_Bisphenols_Report_public_23502_en.pdf) (accessed on August 12<sup>th</sup> 2022).
- Elsersek, T., Notersberg, T., Kovačič, A., Heath, E., & Filipič, M. (2021). The effects of bisphenol A, F and their mixture on algal and cyanobacterial growth: from additivity to antagonism. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 3445-3454.
- European Commission. Commission directive 2011/8/EU of 28 January 2011 amending directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles. Off. J. Eur. Union 10-05-2013.
- Fu, P., & Kawamura, K. (2010). Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environmental Pollution*, 158, 3138-3143.
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J. P., Goeyens, L., Lecomte, P., ... & Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology*, 50, 3725-3740.
- Gerona, R. R., Woodruff, T. J., Dickenson, C. A., Pan, J., Schwartz, J. M., Sen, S., ... & Hunt, P. A. (2013). Bisphenol-A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in a northern and central California population. *Environmental science & technology*, 47, 12477-12485.
- Government of Canada. Order amending schedule I to the hazardous products act (Bisphenol A), Part II, 144,7. Government of Canada. 2010. [http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca/challeng-defi/batch-lot-2/bisphenol-a/bpa-risk\\_hazard-eng.php](http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca/challeng-defi/batch-lot-2/bisphenol-a/bpa-risk_hazard-eng.php) (accessed on October 10<sup>th</sup>, 2022).
- Guillard, R. R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals* (pp. 29-60). Springer, Boston, MA.



- Guiry M.D. & Guiry G.M. 04 June 2021. *AlgaeBase*. Word-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; (accessed on October 19<sup>th</sup>, 2022)
- Guo, J., Venier, M., Salamova, A., & Hites, R. A. (2017). Bioaccumulation of Dechloranes, organophosphate esters, and other flame retardants in Great Lakes fish. *Science of the Total Environment*, *583*, 1-9.
- Higashihara, N., Shiraishi, K., Miyata, K., Oshima, Y., Minobe, Y., & Yamasaki, K. (2007). Subacute oral toxicity study of bisphenol F based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline no. 407”. *Archives of toxicology*, *81*, 825-832.
- Huang, Y. Q., Wong, C. K. C., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., ... & Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment international*, *42*, 91-99.
- Huang, C., Wu, L. H., Liu, G. Q., Shi, L., & Guo, Y. (2018). Occurrence and ecological risk assessment of eight endocrine-disrupting chemicals in urban river water and sediments of South China. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *75*, 224-235.
- Ike, M., Chen, M. Y., Danzl, E., Sei, K., & Fujita, M. (2006). Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water science and technology*, *53*, 153-159.
- Janknegt, P. J., De Graaff, C. M., Van de Poll, W. H., Visser, R. J., Rijstenbil, J. W., & Buma, A. G. (2009). Short-term antioxidative responses of 15 microalgae exposed to excessive irradiance including ultraviolet radiation. *European Journal of Phycology*, *44*, 525-539.
- Ji, K., Hong, S., Kho, Y., & Choi, K. (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental science & technology*, *47*, 8793-8800.
- Khalil, N., Ebert, J. R., Wang, L., Belcher, S., Lee, M., Czerwinski, S. A., & Kannan, K. (2014). Bisphenol A and cardiometabolic risk factors in obese children. *Science of the total environment*, *470*, 726-732.

Lee, S., Liu, X., Takeda, S., & Choi, K. (2013). Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*, *93*, 434-440.

Merchant Research and Consulting Ltd, 2013, Merchant Research & Consulting Ltd. World BPA Production Grew by Over 372,000 Tonnes in 2012 Available from:(2013): <https://mcgroup.co.uk/news/20131108/bpa-production-grew-372000-tonnes.html/> (Accessed on October 16<sup>th</sup>, 2022)

Naderi, M., Wong, M. Y., & Gholami, F. (2014). Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic toxicology*, *148*, 195-203.

Nakagawa, Y., & Tayama, S. (2000). Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Archives of toxicology*, *74*, 99-105.

Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, *22*, 867-880.

Pisapia, L., Del Pozzo, G., Barba, P., Caputo, L., Mita, L., Viggiano, E., ... & Diano, N. (2012). Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, *178*, 54-63.

Rancière, F., Lyons, J. G., Loh, V. H., Botton, J., Galloway, T., Wang, T., ... & Magliano, D. J. (2015). Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. *Environmental Health*, *14*, 1-23.

Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive toxicology*, *42*, 132-155.

Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental health perspectives*, *123*, 643-650.

Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *127*, 27-34.

- Rubin, B. S., Lenkowski, J. R., Schaeberle, C. M., Vandenberg, L. N., Ronsheim, P. M., & Soto, A. M. (2006). Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology*, *147*, 3681-3691.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., & Thorne, C. A. (1989). Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiologia Plantarum*, *77*, 449-456.
- Stroheker, T., Chagnon, M. C., Pinnert, M. F., Berges, R., & Canivenc-Lavier, M. C. (2003). Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reproductive toxicology*, *17*, 421-432.
- UE. Regolamento 2016/2235 della Commissione del 12 dicembre 2016 che modifica l'allegato XVII del regolamento (CE) n. 1907/2006 del parlamento europeo e del consiglio relativo alla registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda il bisfenolo A. Off. J.Eur. Unione 2016, L337, 3–5.
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology*, *24*, 139-177.
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews*, *30*, 75-95.
- Vasiljevic, T., & Harner, T. (2021). Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *Science of The Total Environment*, *789*, 148013.
- Villanova, V. (2016). Identification of the mechanism of mixotrophy in *Phaeodactylum tricornutum*.
- Völkel, W. (2017). Lesson of 15-year exposure to Bisphenol A: a critical discussion of biomonitoring studies. *Archives of Toxicology*, *91*, 3693-3696.
- Wang, I. J., Chen, C. Y., & Bornehag, C. G. (2016). Bisphenol A exposure may increase the risk of development of atopic disorders in children. *International journal of hygiene and environmental health*, *219*, 311-316.

- Xiao, C., Wang, L., Zhou, Q., & Huang, X. (2020). Hazards of bisphenol A (BPA) exposure: A systematic review of plant toxicology studies. *Journal of hazardous materials*, 384, 121488.
- Xie, J., Zhao, N., Zhang, Y., Hu, H., Zhao, M., & Jin, H. (2022). Occurrence and partitioning of bisphenol analogues, triclocarban, and triclosan in seawater and sediment from East China Sea. *Chemosphere*, 287, 132218.
- Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., & Yakabe, Y. (2004). Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicology letters*, 146, 111-120.
- Yamazaki, E., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, J., Lam, P. K., Moon, H. B., ... & Kannan, K. (2015). Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, 565-572.
- Yang, Y., Lu, L., Zhang, J., Yang, Y., Wu, Y., & Shao, B. (2014). Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1328, 26-34.
- Yu, G., Huang, S., Luo, X., Zhao, W., & Zheng, Z. (2022). Single and combined toxicity effects of nanoplastics and bisphenol F on submerged the macrophyte *Hydrilla verticillata*. *Science of The Total Environment*, 814, 152564.
- Zhao, X., Qiu, W., Zheng, Y., Xiong, J., Gao, C., & Hu, S. (2019). Occurrence, distribution, bioaccumulation, and ecological risk of bisphenol analogues, parabens and their metabolites in the Pearl River Estuary, South China. *Ecotoxicology and environmental safety*, 180, 43-52.