



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

**VALUTAZIONE DI RISPOSTE BIOCHIMICHE IN EPATOPANCREAS DI
CROSTACEI (*Carcinus aestuarii*) ALIMENTATI CON VONGOLE
ESPOSTE AD ANALOGHI DEL BISFENOLO A**

Relatore: Prof. Valerio Matozzo

Dipartimento di biologia

Co-relatore: Dott. Jacopo Fabrello

Dipartimento di biologia

Laureanda: Alessia Romanello

Matricola n. 2041741

Anno accademico 2023/2024

INDICE

1. Introduzione	1
1.1 I biomarkers	1
1.2 I bisfenoli	1
1.3 Bisfenolo A: effetti e regolamentazione	2
1.4 BPAF, BPF, BPS: struttura chimica, impiego e produzione	3
1.5 Concentrazioni e tossicità	5
2. Scopo della tesi	8
3. Materiali e metodi	9
3.1 Stabulazione ed esposizione delle vongole	9
3.2 Stabulazione ed esposizione dei granchi	9
3.3 Raccolta e preparazione dei tessuti dei granchi	10
3.4 CUPric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)	10
3.5 Attività della superossido dismutasi (SOD)	11
3.6 Attività della catalasi (CAT)	11
3.7 Attività della glutazione reduttasi (GR)	11
3.8 Attività della glutazione S-transferasi (GST)	12
3.9 Attività degli enzimi amilolitici	12
3.10 Analisi delle proteine totali di Bradford	13
3.11 Analisi statistica	13
4. Risultati	14
4.1 CUPRAC	14
4.2 Attività della superossido dismutasi (SOD)	15
4.3 Attività della catalasi (CAT)	15
4.4 Attività della glutazione reduttasi (GR)	16
4.5 Attività della glutazione S-transferasi (GST)	17
4.6 Attività degli enzimi amilolitici	18
5. Discussione	20
6. Letteratura citata	24

1. INTRODUZIONE

1.1 I biomarkers

I biomarkers, o biomarcatori, sono strumenti di diagnosi precoce indispensabili nell'ecotossicologia in quanto permettono di evidenziare eventuali rischi per un organismo bioindicatore, misurandoli a diversi gradi di complessità biologica. Il biomarker ecotossicologico, nello specifico, può essere definito come quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico, o a livello dell'intero organismo che dà evidenza di esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti [1]. Biomarkers ecotossicologicamente rilevanti sono ad esempio gli immunomarkers, la misura di risposte fisiologiche e comportamentali e biomarkers genomici [2]. I ruoli che rivestono i biomarkers possono essere molteplici. In particolare, vengono utilizzati al fine di studiare le minacce alla salute umana che possono sorgere ad esempio dall'ingestione di cibo e/o acqua contaminata. Sono anche importanti per monitorare la sopravvivenza di determinate specie, impedendone il declino, il quale può essere indotto da ragioni commerciali, ricreative, estetiche o biologiche [3]. L'obiettivo tangibile dello sviluppo dei biomarkers in tutte le situazioni proposte è quindi quello di utilizzarli come "early warning systems", cioè sistemi di allarme precoce [4].

1.2 I bisfenoli

I bisfenoli (BPs) sono composti chimici organici largamente utilizzati nella sintesi di materie plastiche, caratterizzati dalla presenza di due idrossifenili. Modellati ad alte temperature, queste sostanze vanno a costituire diversi oggetti della quotidianità; in particolare, vengono utilizzati per l'indurimento della plastica e, essendo contenuti in quest'ultima, si dissolvono facilmente negli alimenti e bevande, esponendo l'individuo sia direttamente (via orale) che indirettamente (con l'inquinamento ambientale e/o catena alimentare) alla loro

potenziale tossicità [5]. A causa dell'assiduo uso e riutilizzo degli oggetti di plastica, l'uomo inconsciamente ha sempre avuto al suo interno una concentrazione di bisfenoli [5].

1.3 Bisfenolo A: effetti e regolamentazione

Il bisfenolo A (BPA), nome comune del 2,2-bis(4-idrossidifenil) propano (Fig.1), è il più noto rappresentante tra i bisfenoli, che ha trovato largo impiego nella sintesi di policarbonato, resine epossidiche e vernici [6].

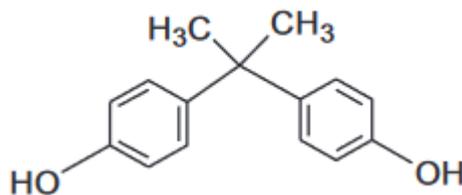


Fig.1 Struttura chimica del bisfenolo A

Il BPA è uno dei prodotti chimici con maggior volume di produzione al mondo: nel 2015 ha raggiunto i 7,7 milioni di tonnellate ed era previsto raggiungesse i 10,6 milioni di tonnellate nel 2022 [7], con più di 100 tonnellate rilasciate nell'atmosfera annualmente [8]. Circa il 30% della produzione di BPA è usato nella produzione di resine epossidiche, il 65% è usato nella manifattura del policarbonato (PC) tramite processi di polimerizzazione, mentre il rimanente 5% è usato in altre applicazioni [9]. Sintetizzato nel 1891 dal chimico russo Dianin [10], questo composto è stato identificato come interferente endocrino negli anni '30 dal medico britannico Dodds a causa della sua abilità nell'alterare la composizione ormonale degli organismi viventi [11]. Negli anni '50 furono messe in commercio le resine epossidiche, utilizzate nel rivestimento di tubi dell'acqua, lattine, adesivi e dispositivi odontoiatrici [11]. Nel 1957 fu invece scoperto dai chimici della Bayer and General Electric un altro utilizzo del BPA, ovvero una plastica dura chiamata policarbonato, successivamente impiegata per automobili, dispositivi di sicurezza e contenitori per alimenti [11]. Il BPA è stato identificato come sostanza chimica estrogenica, che può modificare le naturali funzioni endocrine

legandosi al recettore degli estrogeni e, di conseguenza, provocando effetti negativi sulla salute umana e fauna selvatica, causando patologie come cancro al seno, endometriosi e infertilità [12]. L'esposizione a questo composto è avvenuta per anni tramite policarbonato e resine epossidiche che rivestivano ad esempio contenitori per alimenti e lattine, nonché tubi per l'acqua e tappi di bottiglia. Inoltre, il BPA è stato usato anche nella produzione della carta termica per gli scontrini e per dispositivi odontotecnici [13]. Nonostante l'aria, la polvere e l'acqua siano possibili fonti, la principale fonte di esposizione al BPA sembra essere la dieta. Le più alte assunzioni giornaliere si verificano nei neonati e bambini [13] e possono comportare diverse malattie come diabete, obesità, problemi cardiovascolari, respiratori cronici e renali, problemi comportamentali, problemi nello sviluppo dentale, oltre a quelli già citati sopra [14-16]. Diverse istituzioni come la *National Toxicology Program* nel 2008 e *Food and Drugs Administration* nel 2010 hanno avanzato preoccupazioni nei confronti di questa sostanza, a causa delle quali poi Giappone, Canada e la maggior parte degli Stati Uniti hanno vietato l'utilizzo del BPA nei materiali a contatto con alimenti, in particolare per i potenziali effetti negativi sulla salute dei neonati e dei bambini [17]. Allo stesso modo, nel 2011 l'Unione Europea ha attuato alcune restrizioni nei confronti del BPA vietando la produzione, la commercializzazione e l'importazione di biberon contenenti BPA [17]. Inoltre, da gennaio 2020, l'UE ha limitato anche l'uso di questo composto a meno dello 0,02% in peso nella carta termica [18].

Questa serie di provvedimenti ha portato l'industria a cercare sostanze chimiche alternative, limitando il BPA ma concentrandosi sui suoi analoghi, quali BPAF, BPF e BPS.

1.4 BPAF, BPF, BPS: struttura chimica, impiego e produzione

In seguito alle evidenze di pericolosità del BPA per l'uomo e gli ecosistemi, sono stati prodotti alcuni sostituti, noti come analoghi del BPA, un gruppo di prodotti chimici strutturalmente simili a quest'ultimo

ugualmente utilizzato nella produzione di resine e plastiche in prodotti BPA-free. Queste sostanze chimiche consistono in due anelli fenolici uniti insieme da un ponte di carbonio o altre strutture chimiche, in grado di sostituire parzialmente il BPA nelle applicazioni industriali. Tuttavia, recenti studi ne hanno dimostrato una tossicità simile a quella del BPA [19].

Il bisfenolo AF (BPAF, o 2,2-Bis(4-idrossifenile) (Fig.2) differisce dal BPA per la presenza di due gruppi CF_3 , al posto dei gruppi metilici legati all'atomo di carbonio centrale, utili a migliorarne la stabilità termica e chimica [20]. Questo composto viene utilizzato nell'elettronica e nelle fibre ottiche, nelle attrezzature per la lavorazione degli alimenti e soprattutto nella sintesi di elastomeri speciali [21]. Per quanto riguarda la produzione annuale di BPAF, negli USA quest'ultima è stata di circa 4.5-220 tonnellate dal 1986 al 2002, mentre l'importazione annuale in EU è di 100-1,000 tonnellate all'anno [22].

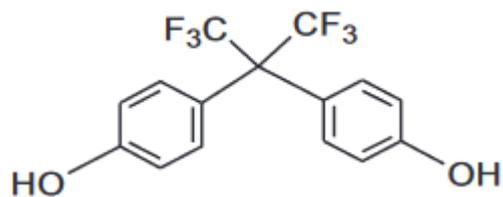


Fig.2 Struttura chimica del BPAF

Il bisfenolo F (BPF o 4,4'-diidrossidifenilmetano) (Fig.3) è un altro membro della famiglia dei bisfenoli, formato da due anelli fenolici uniti da un ponte metilico. Questa sostanza viene utilizzata in applicazioni industriali, tra cui materiali di rivestimento per serbatoi e tubature, materiali per pavimentazioni, prodotti farmaceutici, vernici, adesivi, tubi dell'acqua, sigillanti dentali e imballaggi alimentari [19][23].

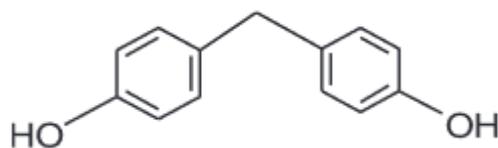


Fig.3 Struttura chimica del BPF

Il bisfenolo S (BPS o bis(4-idrossifenil)solfone) (Fig.4) è un analogo del BPA con due gruppi fenolici legati da un gruppo di anidride solforosa (SO₂) utilizzato per una varietà di applicazioni industriali, ad esempio in prodotti di pulizia, resine epossidiche, biberon e carta termica [24]. Il BPS ha rimpiazzato il BPA in diversi processi manifatturieri raggiungendo una produzione annua tra le 10 mila e 100 mila tonnellate nell'Area Economica Europea [25]. Il BPS ha caratteristiche più acide in confronto agli altri bisfenoli con una minore biodegradabilità in acqua rispetto a BPA e BPF [26] e una maggiore resistenza al calore e alla luce del sole rispetto al BPA [27]. Tutte queste caratteristiche lo rendono più persistente in ambiente, con un tempo di dimezzamento di 135 giorni nei sedimenti, 30 giorni nei suoli e 15 giorni nelle acque [28].

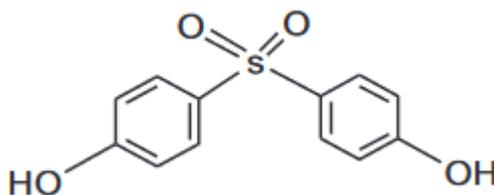


Fig.4 Struttura chimica del BPS

Negli anni, l'utilizzo del BPS è più che raddoppiato passando dalle 200 tonnellate del 2016 alle 397 tonnellate nel 2017 (aumento del 98%). Inoltre, l'*European Chemicals Agency* (ECHA) riporta che il tasso annuale di produzione di BPS è nel range di 10,000-100,000 tonnellate nell'area economica europea [22].

1.5 Concentrazioni e tossicità

In seguito alla crescente produzione e in virtù del loro ampio uso, i BPs possono essere rilasciati in ambiente ed entrare nei corpi idrici attraverso la deposizione atmosferica, le acque di scarto degli scarichi industriali, runoff e le acque reflue urbane [29]. L'accumulo di bisfenoli in organismi acquatici rappresenta una fonte significativa di questi contaminanti per la catena alimentare, con rischi per la salute umana e per l'intero ecosistema [30]. Molti studi hanno rilevato che la

concentrazione di BPA in ambienti acquatici può essere nell'ordine di decine di ng/L. L'Unione Europea a tal riguardo ha stabilito un valore di PNEC (Predicted No Effect Concentration) di 150 ng/L per il BPA delle acque marine, ma in alcuni casi questa concentrazione viene superata, causando effetti nocivi agli organismi acquatici [18]. Gli analoghi del BPA si trovano normalmente in concentrazioni inferiori, nell'ordine di pochi ng/L, eccetto casi particolari, come in un lago e in un fiume urbano in Cina (140 ng/L di BPAF e 65,600 ng/L di BPS) [31][32] e nel fiume Tamagawa in Giappone (2850 ng/L di BPF) [33]. È stato inoltre dimostrato che la tossicità correlata agli xenobiotici in questione ha effetti a livello osseo [34], riproduttivo [35], metabolico [36], di stress ossidativo [37] e neurologico [38]. Elevati livelli di ROS comportano stress ossidativo, danno al DNA e morte cellulare [39-41]. L'esposizione ai bisfenoli altera inoltre l'attività di diversi ormoni, sia su animali che su esseri umani, tra cui quelli sessuali, l'insulina e la tiroxina, aumentando il rischio di obesità e diabete mellito, malattie cardiovascolari e anomalie riproduttive e dello sviluppo come riscontrato in particolare con l'esposizione prenatale e infantile [5]. Nel caso di organismi acquatici, studi recenti hanno evidenziato che gli analoghi del BPA possono provocare danni alle specie non target [18]. Negli invertebrati marini, gli studi condotti con analoghi del BPA hanno evidenziato effetti negativi sugli organismi, a seconda dell'organo colpito, della durata dell'esposizione e della concentrazione del contaminante [42]. Ad esempio, in *Haliotis discus hannai*, una specie di abalone, è stato riscontrato stress ossidativo dovuto all'assunzione di plastificanti per via alimentare, con conseguente alterazione dei livelli di ROS e danneggiamento di DNA, proteine e lipidi, e innesco di risposte antiossidanti e danno cellulare [43]. In altri invertebrati, l'esposizione a ftalati e bisfenoli, ha provocato alterazioni sul metabolismo dei grassi e riduzione della durata di vita in piccoli crostacei planctonici di *Daphnia magna*, inibizione degli enzimi antiossidanti e genotossicità nel mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis*, interferenza con il sistema endocrino e citotossicità sul gambero di acqua dolce *Astacus*

leptodactylus, problemi di sviluppo neuronale nella pigna di mare *Phallusia mammillata* e diminuzione della capacità di filtrazione nella vongola asiatica *Corbicula fluminea* [44-48]. In *Astacus leptodactylus*, è stato inoltre dimostrato che le microplastiche possono essere trasportate all'epatopancreas tramite il sistema circolatorio [49]. Le ricerche condotte sugli analoghi del BPA non sono molte e tuttora non sono stati pubblicati studi che hanno valutato l'effetto di questi composti ad un livello superiore, ad esempio lungo una catena trofica.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è stato di valutare le risposte biochimiche nell'epatopancreas di esemplari di *Carcinus aestuarii* in seguito alla loro alimentazione con vongole della specie *Ruditapes philippinarum* precedentemente esposte per due settimane ad analoghi del bisfenolo A, in particolare BPAF, BPF, PBS e MIX dei tre.



Fig.5 Esemplare di *R. philippinarum*



Fig.6 Esemplari di *C. aestuarii*

I bisfenoli sono considerati dannosi per l'ambiente; il bisfenolo A (BPA) in particolare, è già stato sottoposto dalla Comunità Europea a regolamentazione a causa del suo noto coinvolgimento come interferente endocrino con effetti estrogenici. Gli analoghi del BPA sono invece contaminanti emergenti ed ubiquitari, i quali hanno sostituito in gran parte il ruolo del BPA nella produzione industriale. Alcune ricerche hanno messo in luce quanto questi composti siano altrettanto pericolosi, dal momento che presentano attività estrogeniche paragonabili a quelle del bisfenolo A.

Per l'esperimento è stata scelta la specie *Ruditapes philippinarum* in quanto si può trovare comunemente in Laguna di Venezia, è facile da mantenere in laboratorio, ed essendo un filtratore capta facilmente gli xenobiotici. Per quanto riguarda i granchi della specie *Carcinus aestuarii*, sono animali altrettanto comuni in Laguna di Venezia, facilmente adattabili a diverse condizioni ambientali e che li rendono quindi ottimi bioindicatori, oltre al loro importante valore economico. Dopo l'alimentazione con vongole contaminante, l'epatopancreas dei granchi è stato prelevato dopo 7 e 14 giorni, al fine di valutare il possibile stress ossidativo e gli effetti su enzimi coinvolti nel metabolismo energetico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Stabulazione ed esposizione delle vongole

Gli esemplari di *Ruditapes philippinarum* sono stati prelevati nel gennaio 2024 dalla laguna di Venezia in una zona di concessione per l'allevamento dei molluschi. In seguito, è avvenuta una fase di acclimatazione di 5 giorni in laboratorio, mantenendo gli animali in vasche contenenti sabbia e acqua marina a 35 di salinità e 18 °C di temperatura.

Sono state preparate una soluzione madre (100 mg/L) di BPAF e BPF in metanolo, mentre la soluzione di BPS è stata preparata in acqua distillata.

Successivamente, le vongole (70 per condizione sperimentale) sono state trasferite in 15 vasche da 30 L ciascuna, 3 per ognuna delle 5 condizioni sperimentali. Nello specifico, le 5 condizioni consistevano in: controllo (C), BPAF, BPF, BPS e miscela delle tre (MIX). Queste sostanze sono state addizionate all'interno degli acquari ad una concentrazione finale di 300 ng/L per i singoli trattamenti e di 100 ng/L ciascuno per la MIX dei tre. Durante la fase di esposizione, durata 14 giorni, le vongole sono state nutrite a giorni alterni con 250 mL di una sospensione microalgale di *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis chui*, prive di bisfenoli. Contestualmente è stata rinnovata l'acqua e i bisfenoli sono stati ridosati in acquario. Ogni vasca è stata inoltre munita di aeratore e tenuta priva di substrato. Passati i 14 giorni dell'esposizione ai bisfenoli, le vongole provenienti da ogni condizione sperimentale sono state sgusciate, congelate in azoto liquido e conservate a -20 °C.

3.2 Stabulazione ed esposizione dei granchi

Gli esemplari di *Carcinus aestuarii*, sono stati prelevati nel febbraio 2024, sempre nella laguna di Venezia, mediante nasse. Successivamente, sono stati acclimatati come precedentemente descritto per le vongole e per svolgere l'esperimento sono stati selezionati solamente individui di sesso maschile e completi di tutte le parti anatomiche. Per ogni condizione

sperimentale (C, BPAF, BPF, BPS e MIX) sono state preparate 2 vasche (30 L), ciascuna dotata di aeratore e prive di substrato, nelle quali sono stati inseriti 30 granchi. Tutti i granchi sono stati alimentati con mezza vongola ciascuno a giorni alterni per un totale di 14 giorni.

3.3 Raccolta e preparazione dei tessuti dei granchi

Dopo 7 e 14 giorni di alimentazione sono stati allestiti 5 pool di granchi, composti ciascuno da 4 animali per ciascun trattamento, dai quali sono stati asportati diversi tessuti, tra cui l'epatopancreas, oggetto di studio della tesi. I tessuti sono stati poi congelati in azoto liquido e conservati a -80°C per poi essere scongelati a tempo debito.

Al fine di poter svolgere le analisi biochimiche, è stato necessario preparare un tampone di estrazione utilizzando 1,21 g di TRIS (10 mM) / 1L di acqua distillata + 11,2 g di KCl (0,15 M) + 171,2 g di saccarosio (0,5 M), il tutto portato a pH 7,6 con HCl (10mM). In seguito, i tessuti sono stati omogeneizzati in 1 mL di tampone tramite un omogeneizzatore TissueLyser (model LT) per 10 minuti e poi centrifugati a 12000 rpm per 30 minuti a 4°C. Tutte le seguenti analisi sono state eseguite sul supernatante ottenuto dopo la centrifugazione.

3.4 CUPric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)

La CUPRAC è un'analisi che permette di quantificare il livello di antiossidanti totali di un determinato campione biologico. L'analisi è stata svolta in micropiastra seguendo il metodo proposto da Apak et al. [50] utilizzando il rame Cu^{++} che viene ridotto a rame Cu^+ dai composti antiossidanti. Il rame viene poi chelato dalla neocuproina permettendo di quantificarlo a 450 nm utilizzando un lettore di micropiastra. Per esprimere il dato finale, è stata preparata una retta di calibrazione utilizzando un analogo della vitamina E (Trolox) e il dato è stato espresso come mM di equivalenti di Trolox/ mg proteine.

3.5 Attività della superossido dismutasi (SOD)

La superossido dismutasi (SOD) è un enzima antiossidante che serve a dismutare l'anione superossido che si può generare nella cellula, il quale è una specie reattiva dell'ossigeno (ROS). Eliminando l'anione superossido, la reazione catalizzata dalla SOD genera ossigeno molecolare e perossido di idrogeno. Il metodo impiegato è stato quello di Crapo et al. [51], aggiungendo a 930 µL di tampone fosfato 30 µL di supernatante, 20 µL di ipoxantina e 10 µL di xantina ossidasi che originano anione superossido, il quale a sua volta riduce il citocromo c (presente in 10 µL). La SOD però inibisce la riduzione di quest'ultimo. L'assorbanza viene letta a 550 nm nello spettro del visibile per 30 secondi, producendo risultati esprimibili in U SOD/ mg proteine.

3.6 Attività della catalasi (CAT)

L'azione della catalasi (CAT) invece, è quella di eliminare il perossido di idrogeno, altra specie reattiva dell'ossigeno. La CAT catalizza quindi la conversione del perossido di idrogeno ad acqua e ossigeno molecolare secondo la reazione:



Seguendo il metodo proposto da Aebi [52], sono stati aggiunti 30 µL di supernatante a 970 µL di substrato contenente perossido di idrogeno. L'assorbanza è stata letta a 240 nm (UV) per 30 secondi. I risultati sono stati espressi come U CAT/ mg di proteine.

3.7 Attività della glutazione reduttasi (GR)

La glutazione reduttasi (GR), è un enzima che riduce il glutatione in stato ossidato (GSSG) e lo ricostituisce a glutatione in stato ridotto (GSH), secondo la reazione:



Il metodo utilizzato in questa analisi è quello proposto da Smith et al. [53] in cui la GR trasforma il GSSG in GSH grazie al NADPH. Il GSH formato reagisce successivamente con DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) dando origine a TNB (5-thio (2-nitrobenzoic acid)). Quest'ultimo viene rilevato grazie ad un incremento di assorbanza a 412 nm per 3 minuti. L'attività è stata espressa in U GR/ mg proteine.

3.8 Attività della glutatione S-transferasi (GST)

Le Glutatione S-transferasi (GST) sono un gruppo di isoenzimi detossificanti che catalizzano la coniugazione di uno xenobiotico con una molecola di glutatione (GSH), rendendolo meno reattivo e più facilmente eliminabile dall'organismo. Più precisamente, secondo il metodo descritto da Habig et al. [54], il GSH si lega ad un substrato specifico ovvero l'1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) al fine di poter essere quantificato allo spettrofotometro a 340 nm. L'attività enzimatica viene quindi espressa in nmol/min/mg proteine.

3.9 Attività degli enzimi amilolitici

Gli enzimi amilolitici sono una categoria di enzimi responsabili dell'idrolisi dell'amido e tra i più noti si possono trovare α -amilasi, β -amilasi e amiloglucosidasi. Al fine di quantificare gli enzimi amilolitici è stato seguito il metodo di Oliveira et al. [55] che permette di misurare l'attività enzimatica di α -amilasi e amiloglucosidasi. Brevemente, l'amido utilizzato come substrato viene digerito dal supernatante di tessuto biologico contenente gli enzimi amilolitici ed in seguito viene aggiunto HCl per cessare la digestione da parte degli enzimi. La quantità di amido rimasta viene quantificata tramite titolazione iodometrica e viene analizzata tramite spettroscopia UV-VIS a 580 nm. I risultati sono stati espressi in U Amyl/ mg proteine.

3.10 Analisi delle proteine totali di Bradford

Al fine di quantificare il contenuto di proteine totali nei campioni di supernatante di tessuto, è stato utilizzato il metodo di Bradford [56]. L'assorbanza è stata letta a 595 nm. La concentrazione di proteine totali (mg/mL) di ciascun campione biologico è stata utilizzata per normalizzare i valori ottenuti dalle precedenti analisi biochimiche.

3.11 Analisi statistica

I risultati ottenuti sono stati valutati statisticamente tramite un'analisi delle varianze (ANOVA a due vie), in cui i parametri indipendenti erano il tempo di esposizione, il trattamento (=dieta) e la loro interazione. All'ANOVA è seguito un test post-hoc (Fisher LSD) per il confronto a coppie. Il software utilizzato per l'analisi statistica è stato OriginPro 2022. I risultati sono stati espressi tramite boxplot, i quali indicano la distribuzione dei dati dal primo al terzo quartile. La linea al centro di essi è invece rappresentata dalla mediana, mentre le barre di errore stanno ad indicare la distanza tra il valore minimo e massimo, dopo aver escluso gli outliers.

4. RISULTATI

I confronti a coppie (test di Fisher) tra le diverse condizioni sperimentali sono stati effettuati solo quando la preliminare analisi dell'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo dei fattori "trattamento" (=dieta) e/o "interazione trattamento*tempo di esposizione".

4.1 CUPRAC

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo solo del fattore "tempo" ($p < 0,05$) sui livelli degli antiossidanti totali (Tabella 1); non essendoci l'effetto del "trattamento" o dell'interazione tra "tempo*trattamento" non è stato eseguito il test post-hoc (confronto a coppie) (Fig. 7).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	0,08415	0,08415	6,07908	0,01807
Trattamento	4	0,08054	0,02013	1,45455	0,2341
Interaction	4	0,03619	0,00905	0,65363	0,62774
Model	9	0,20088	0,02232	1,61242	0,14475
Error	40	0,5537	0,01384		
Corrected Total	49	0,75457			

Tab.1. ANOVA a due vie per il saggio della CUPRAC

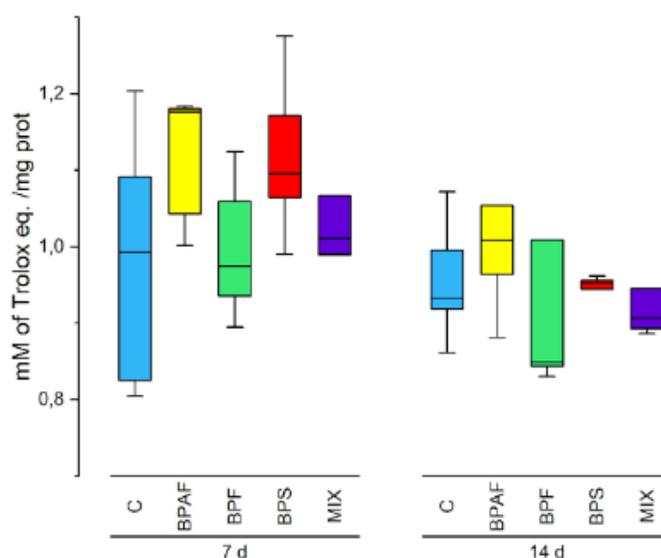


Fig.7. Livelli totali di antiossidanti in granchi alimentati con bivalvi esposti ad analoghi del BPA, espressi in mM equivalenti di Trolox/ mg di proteine.

I valori sono riportati tramite boxplot. N=5.

4.2 Attività della superossido dismutasi (SOD)

L'attività della SOD è stata influenzata solamente dal fattore "tempo" ($p < 0,01$) (ANOVA: Tabella 2) e non per il fattore "trattamento" o "tempo*trattamento" (Fig. 8).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	88,8457	88,8457	9,29609	0,00406
Trattamento	4	31,23215	7,80804	0,81697	0,52198
Interaction	4	97,40953	24,35238	2,54804	0,05404
Model	9	217,48738	24,16526	2,52846	0,02127
Error	40	382,29273	9,55732		
Corrected Total	49	599,7801			

Tab.2. ANOVA a due vie per l'attività della SOD.

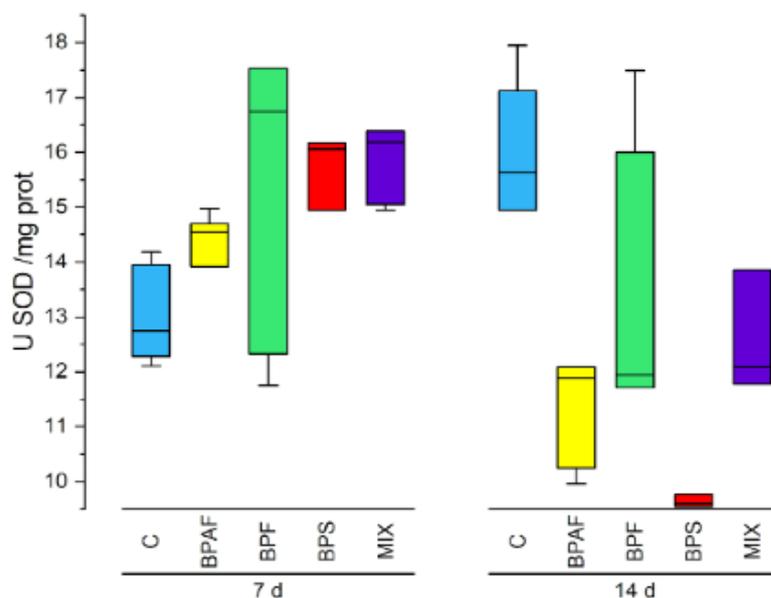


Fig.8. Attività della SOD in granchi alimentati con bivalvi esposti ad analoghi del BPA, espressa in U SOD/ mg di proteine. I valori sono riportati tramite boxplot. N=5.

4.3 Attività della catalasi (CAT)

L'ANOVA a due vie ha indicato un effetto statisticamente significativo solo del fattore "tempo" ($p < 0,01$) (Tabella 3) sull'attività della CAT (Fig.9).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	797,95649	797,95649	12,48327	0,00105
Trattamento	4	447,9199	111,97998	1,75182	0,15774
Interaction	4	531,94209	132,98552	2,08043	0,10143
Model	9	1777,81848	197,53539	3,09025	0,00656
Error	40	2556,88299	63,92207		
Corrected Total	49	4334,70147			

Tab.3. ANOVA a due vie per l'attività della CAT.

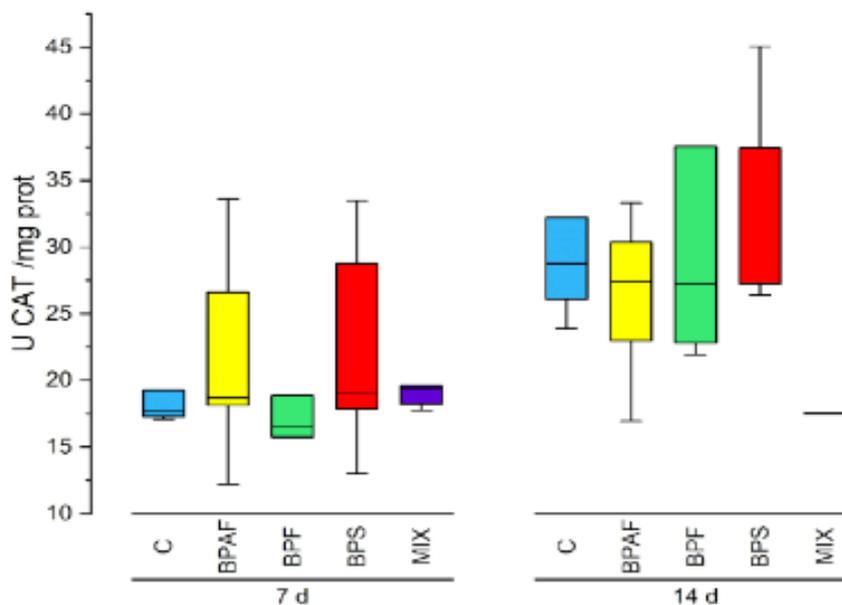


Fig.9. Attività della catalasi in granchi alimentati con bivalvi esposti ad analoghi del BPA, espressa in U CAT/ mg di proteine. I valori sono riportati tramite boxplot. N=5.

4.4 Attività della glutazione reduttasi (GR)

Per quanto riguarda la GR, l'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore "trattamento" ($p < 0,05$) (Tab. 4). Il test post-hoc però, non ha rilevato variazioni importanti in alcun trattamento, sia dopo 7 che 14 giorni (Fig. 10).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	0,00132	0,00132	0,41935	0,52096
Trattamento	4	0,03412	0,00853	2,71721	0,04308
Interaction	4	0,01053	0,00263	0,8387	0,50885
Model	9	0,04597	0,00511	1,627	0,14053
Error	40	0,12557	0,00314		
Corrected Total	49	0,17154			

Tab.4. ANOVA a due vie per l'attività della GR.

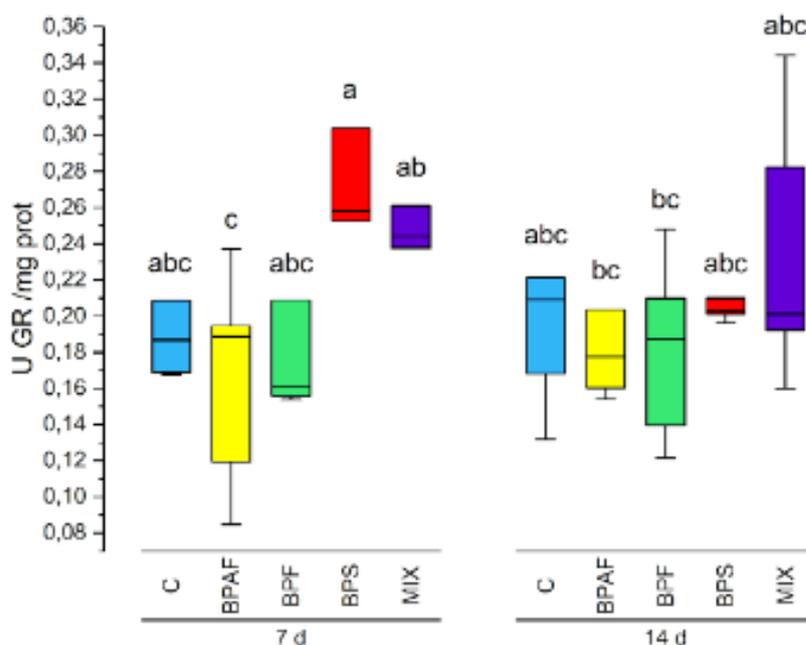


Fig.10. Attività della GR in granchi alimentati con bivalvi esposti ad analoghi del BPA, espressa in U GR/ mg di proteine. Lettere non condivise indicano differenze significative rispetto al controllo. I valori sono riportati tramite boxplot. N=5.

4.5 Attività della glutazione S-transferasi (GST)

L'attività della GST è risultata statisticamente influenzata sia dal fattore "trattamento" ($p < 0,05$), che dal fattore "interazione tempo*trattamento" ($p < 0,01$) (Tab. 5). È stata rilevata una diminuzione significativa dell'attività della GST nei granchi alimentati per 7 giorni con vongole contaminate da BPAF e MIX (Fig. 11).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	32644,80 41	32644,80 41	0,25155	0,61873
Trattamento	4	1739830, 33746	434957,5 8436	3,35169	0,01857
Interaction	4	2477655, 25712	619413,8 1428	4,77307	0,00304
Model	9	4250130, 39868	472236,7 1096	3,63896	0,00214
Error	40	5190903, 39025	129772,5 8476		
Corrected Total	49	9441033, 78893			

Tab.5. ANOVA a due vie per l'attività della GST

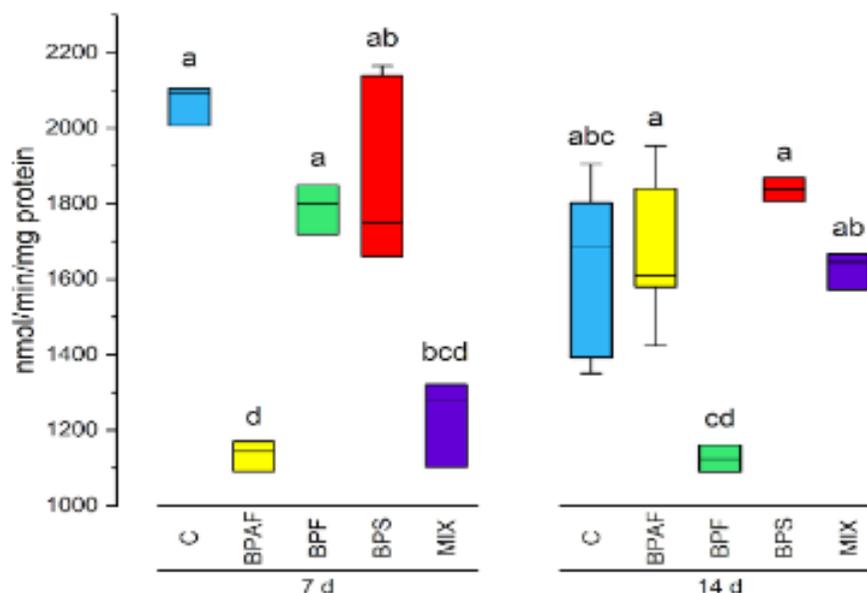


Fig.11. Attività della GST in granchi alimentati con bivalvi esposti ad analoghi del BPA, espressa in nmol/min / mg di proteine. Lettere non condivise indicano differenze rilevanti rispetto al controllo. I valori sono riportati tramite boxplot. N=5.

4.6 Attività degli enzimi amilolitici

L'ANOVA a due vie ha rilevato effetti statisticamente significativi sull'attività degli enzimi amilolitici sia ad opera del fattore "tempo" ($p < 0,01$) che del fattore "trattamento" ($p < 0,001$) (Tab. 6). In particolare, il test post-hoc ha evidenziato una diminuzione dell'attività degli enzimi amilolitici nei granchi alimentati per 7 giorni con vongole contaminate da BPS e MIX, mentre dopo due settimane si assiste ad una significativa diminuzione dell'attività enzimatica in tutti i granchi alimentati con vongole contaminate, rispetto al controllo (Fig. 12).

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Tempo	1	0,61768	0,61768	11,99614	0,00128
Trattamento	4	1,49369	0,37342	7,25232	1,72391E-4
Interaction	4	0,16201	0,0405	0,7866	0,54073
Model	9	2,27337	0,2526	4,90576	1,88515E-4
Error	40	2,0596	0,05149		
Corrected Total	49	4,33297			

Tab. 6. ANOVA a due vie per l'attività degli enzimi amilolitici

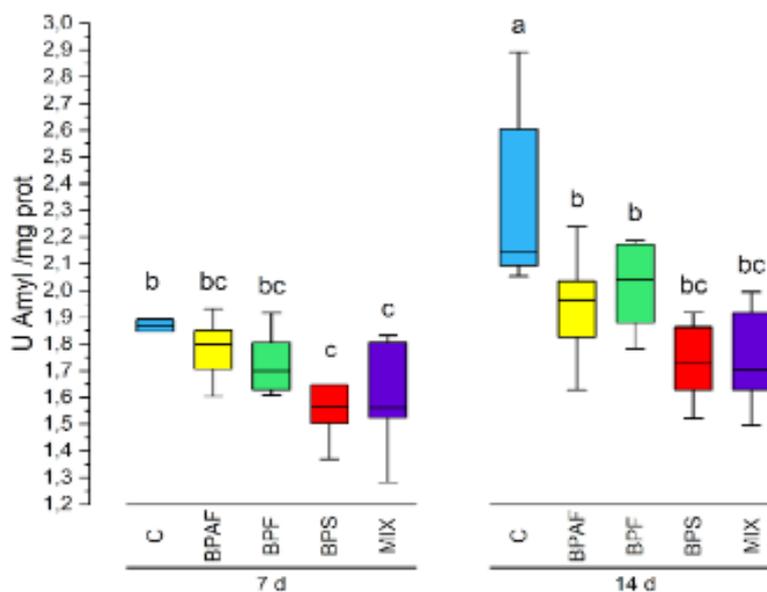


Fig.12. Attività degli enzimi amilolitici in granchi alimentati con bivalvi esposti ad analoghi del BPA, espressa in U Amyl/ mg di proteine. Lettere non condivise indicano differenze significative rispetto al controllo. I valori sono riportati tramite boxplot. N=5.

5. DISCUSSIONE

L'evidenza degli effetti tossici del BPA (in particolare come interferente endocrino) ha orientato l'industria chimica verso la produzione di prodotti "BPA-free" definiti analoghi del BPA, quali ad esempio BPAF, BPF e BPS, dei quali però non si hanno ancora molti dati sui potenziali effetti tossici sull'uomo e sull'ambiente. Tuttavia, si presume che, a causa della somiglianza strutturale con il BPA e le simili proprietà chimico-fisiche quali lipofilia, stabilità, elevata persistenza e potenziale bioaccumulo negli organismi, questi sostituti possano mostrare una tossicità simile a quella del BPA [57]. In questo studio, le tre sostanze prese in considerazione (BPAF, BPF e BPS) e la loro miscela sono state appositamente somministrate a concentrazioni riscontrabili in ambiente (300 ng/L) a vongole utilizzate poi come alimento per granchi. In questo studio, sono stati utilizzati esemplari di *Ruditapes philippinarum* (anche nota come vongola verace filippina), in quanto, essendo organismi filtratori, sono costantemente in contatto con particelle esterne e quindi sono in grado assumere facilmente anche sostanze inquinanti come i bisfenoli, oltre ad essere una specie che rientra nella dieta del granchio. Gli esemplari di *Carcinus aestuarii* (granchio verde comune) sono stati scelti sempre per la facilità di reperibilità, per il valore economico ed ecologico che hanno nella laguna veneta. Per le analisi è stato prelevato l'epatopancreas in quanto nei crostacei, come in altri invertebrati marini, è un organo importante per la digestione e per l'accumulo di sostanze nocive [58].

È noto che l'esposizione a contaminanti, inclusi i bisfenoli, può provocare uno sbilancio tra il sistema di difesa antiossidante (CAT, SOD, GR, GST ecc.) e le ROS [59]. Ciò viene testimoniato in alcuni studi su invertebrati, come quello di Park et al. [60] svolto sulla specie *Brachionus koreanus*, un rotifero marino esposto a BPF, BPS e BPA per 24h in acqua marina, e quello di Zhang et al. [58] effettuato sul gambero d'acqua dolce *Procambarus clarkii* esposto per una settimana a 225 µg/L di BPA. Questi ultimi dimostrano che l'esposizione a queste sostanze comporta un aumento dei livelli di ROS, le quali interagiscono con lo stato redox dell'organismo

provocando stress, dovuto al fatto che gli enzimi non riescono più a far fronte allo stress ossidativo. Gli analoghi del bisfenolo hanno causato alterazioni del sistema antiossidante e lesioni istopatologiche del sistema respiratorio anche nel cetriolo di mare *Holothuria poli*, in esemplari esposti a 200 µg/L di BPS per 12 giorni [61]. Per quanto riguarda i risultati ottenuti in *Carcinus aestuarii*, il livello di antiossidanti totali misurati tramite il saggio CUPRAC non è risultato alterato dal trattamento (= dieta con vongole esposte agli analoghi del BPA), ma solamente dal tempo di trattamento. In uno studio effettuato da Uçkun [62] sul gambero *Astacus leptodactylus* esposto a BPA, il livello di TAC (Total Antioxidant Capacity) dell'epatopancreas si è dimostrato significativamente più basso (LC50/8 1.38 ± 0.01 , LC50/4 1.25 ± 0.01 , LC50/2 0.93 ± 0.05 , LC50 0.97 ± 0.03 mg prot. /mL) rispetto al controllo (2.24 ± 0.09 mg prot. /mL) in tutti i gruppi esposti al BPA. Nel caso invece della vongola *Ruditapes philippinarum* esposta per un periodo di 7 e 14 giorni agli stessi analoghi del BPA e alle stesse concentrazioni testati in questo studio, la capacità antiossidante è stata influenzata dal fattore interazione "tempo*trattamento" [63]. A proposito dell'attività della SOD e della CAT, essa rivela un effetto significativo solamente del tempo di trattamento, motivo per cui possiamo escludere un effetto della dieta sull'attività di questi enzimi. Se andiamo a confrontare questi risultati con analisi svolte sul granchio asiatico *Charybdis japonica*, esposto a diverse concentrazioni (0.125, 0.25, 0.50, e 1.00 mg/L) di BPA per un massimo di 15 giorni, notiamo un aumento di attività nell'emolinfa e nell'epatopancreas che per la SOD raggiunge il valore più alto il terzo giorno alla concentrazione maggiore di 1 mg/L, mentre per la CAT il gruppo con maggiore attività era quello esposto a 0,5 mg/L di BPA, con un valore massimo raggiunto durante il sesto giorno di esposizione, seguito da un decremento delle attività degli enzimi antiossidanti probabilmente dovuti all'inibizione di questi ultimi con il passare del tempo [64]. L'attività della GR ha subito un effetto significativo del fattore trattamento ($p < 0,05$), sebbene non sia stata alcuna alterazione significativa tra granchi alimentati con vongole contaminate e granchi di controllo. Al contrario, è stato dimostrato da Seoane et al. [48] con la vongola asiatica

Corbicula fluminea e da Uçkun [62] con il gambero *Astacus leptodactylus* che in seguito a un'esposizione di BPA di 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/L per la prima specie e 0.25, 1, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 512, e 2048 mg/L per la seconda, per 96h, l'attività della GR nell'epatopaneas inizialmente aumenta e poi viene inibita all'aumentare della dose. In maniera opposta a quanto riscontrato per la GR, l'attività della GST, che catalizza la reazione tra il GSH e lo xenobiotico rendendolo meno reattivo e più facilmente eliminabile dall'organismo, è stata influenzata dal trattamento. I granchi alimentati con vongole precedentemente esposte a BPAF e MIX mostravano una diminuzione statisticamente significativa dell'attività della GST dopo 7 giorni di alimentazione. Trascorse due settimane invece, non sono state rilevate alterazioni significative dell'attività enzimatica rispetto al controllo. In altri studi, in esemplari di *Daphnia magna* si è riscontrato che in seguito a un'esposizione acuta di 48h a concentrazioni subletali di BPA, l'attività della GST aumenta parallelamente all'incremento della dose di BPA (1,73-6,9 mg/L), ma diminuisce successivamente ad una concentrazione di BPA maggiore (13,8 mg/L) dopo un'esposizione cronica di 21 giorni [65]. Lo stesso andamento è stato dimostrato nello studio svolto sull'epatopaneas della vongola *Ruditapes philippinarum*, con un aumento dell'attività dopo 7 giorni di esposizione a 300 ng/L di BPS e 100+100+100 mg/L di BPAF, BPF e BPS (=MIX), e poi con una successiva diminuzione rispetto al controllo dopo 14 giorni alle stesse condizioni sperimentali [63]. L'attività della GST rilevata da Park et al. [60] in *B. koreanus* invece, mostra in 24h un aumento alla concentrazione maggiore (10 mg/L) di BPA e BPF, mentre per quanto riguarda il BPS si ha un aumento dell'attività fino ad una concentrazione di 5 mg/L e poi un leggero decremento alla dose più alta di 10 mg/L. Un'ulteriore analisi svolta nel presente lavoro riguarda gli enzimi amilolitici, i quali sono responsabili dell'idrolisi dell'amido, importante in quanto fonte di energia per il granchio che, sotto stress, aumenta i livelli di glucosio ottenendolo dalla scissione dell'amido. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i granchi alimentati con vongole esposte a BPS e MIX hanno subito una diminuzione dell'attività degli enzimi amilolitici dopo 7 giorni di dieta rispetto al controllo, con un'ulteriore diminuzione anche successivamente in tutti i

granchi alimentati con vongole contaminate. Un'ulteriore evidenza dell'effetto del BPS sull'amilasi lo possiamo riscontrare in uno studio condotto da Yang et al. [66] sui fanghi di depurazione, il quale ha messo in evidenza come il BPS possa interagire direttamente con il sito catalitico dell' α -amilasi inibendone l'attività soprattutto ad alte concentrazioni (5×10^{-5} e 1×10^{-4} mol/L), influenzando quindi l'enzimolisi dei fanghi. Dopo 14 giorni, oltre all'inibizione degli enzimi amilolitici causati dalla dieta di vongole esposte a BPS e MIX, si assiste anche alla diminuzione dell'attività degli enzimi amilolitici in granchi alimentati con vongole esposte a BPAF e BPF.

In conclusione, nonostante alcuni biomarker (CUPRAC, SOD e CAT) non abbiano evidenziato effetti significativi del trattamento, l'attività della GR e ancor di più della GST e quella degli enzimi amilolitici hanno mostrato risultati interessanti, suggerendo che gli analoghi del BPA possono manifestare effetti tossici anche se veicolati tramite la dieta. In ogni caso, saranno necessari ulteriori studi per approfondire il destino e gli effetti degli analoghi del BPA nella catena trofica marina.

6. LETTERATURA CITATA

- [1] Depledge, M. H. “The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological tools”, *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*; Fossi, M.C.; Leonzio, C. (Eds.); Lewis Publishers: Boca Raton, FL, **1994**, pp 271-295.
- [2] Amiard-Triquet, C.; “Biomarkers of Defense, Tolerance, and Ecological Consequences”, *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*; Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.C.; Rainbow, P.S. (Eds.); CRC Press: Boca Raton, **2013**.
- [3] Depledge, M.H. and Fossi, M.C. *Ecotoxicology* **1994**, 3,161-172.
- [4] Forbes, V.E.; Palmqvist, A.; Bach, L. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2009**, 25, Issue 1, 272-280.
- [5] Kim, J.J.; Kumar, S.; Kumar, V.; Lee, Y.M.; Kim, Y.S.; Kumar, V. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, 17(1), 112.
- [6] Chen, M.Y; Ike, M.; Fujita, M. *Environmental Toxicology* **2002**, 17, Issue 1, 80-86.
- [7] Almeida, S.; Raposo, A.; Almeida-Gonzales, M.; Carrascosa, C. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2018**, 17.
- [8] Vandenberg, L.N.; Maffini, M.V.; Sonnenschein, C.; Rubin, B.S.; Soto, A.M. *Endocrine Reviews* **2009**, 30(1), 75–95
- [9] Hermabessiere, L.; Dehaut, A.; Paul-Pont, I.; Lacroix, C.; Jezequel, R.; Soudant, P.; Duflos, G. *Chemosphere*, **2017**, 182, 781-793.
- [10] Rubin, B.S. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **2011**, 127, 27–34.
- [11] Vogel, S.A. *American Journal of Public Health*, **2009**, 99, No. S3.
- [12] Colborn, T.; “Effects of Endocrine Disruptors on Human and Wildlife Health”, *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice*; Aguirre, A.A.;

Ostfeld, R.S.; Tabor, G.M.; House, C.; Pearl, M.C. (Eds.); Oxford University Press: New York, **2002**.

[13] Shelby, M.D. *NTP CERHR MON.* **2008**, v, vii–ix, 1-64 passim.

[14] Vandenberg, L.N.; Colborn, T.; Hayes, T.B.; Heindel, J.J.; Jacobs, D.R.; Jr., Lee, D.H.; Shioda, T.; Soto, A.M.; vom Saal, F.S.; Welshons, W.V.; Zoeller, R.T.; Peterson Myers, J. *Endocrine Reviews* **2012**, 33(3), 378 – 455.

[15] Rochster, J.R *Reproductive Toxicology* **2013**, 42, 132-155.

[16] Rezg, R.; El-Fazaa, S.; Gharbi, N.; Mornagui, B. *Enviromental International* **2014**, 64, 83-90.

[17] Fic, A.; Žegura, B.; Sollner Dolenc, M.; Filipč, M.; Peterlin Mašič, L. *Arh Hig Rada Toksikol* **2013**,64,189-200.

[18] Fabrello, J.; Matozzo, V. *J. Mar. Sci. Eng.* **2022**, 10, 1271.

[19] Qiu, W.; Shao, H.; Lei, P.; Zheng, C.; Qiu, C.; Yang, M.; Zheng, Y. *Chemosphere* **2018**, 194, 1-8.

[20] Ramírez, V.; Gálvez-Ontiveros, Y.; Porrás-Quesada, P.; Martínez-González, L.J.; Rivas, A.; Álvarez-Cubero, M.J. *Enviromental Research* **2021**, 197, 111062.

[21] Wang, X.; Yang, J.; Wang, Y.; Li, Y.; Wang, F.; Zhang, L. *Journal of Hazardous Materials* **2014**, 276, 105-111.

[22] Hu, Y.; Zhu, Q.; Yan, X.; Liao, C.; Jiang, G. *Environmental Research* **2019**,178, 108732.

[23] Rochester, J.R.; Bolden, A.L. *Environmental Health Perspectives* **2015**, 123, No.7.

[24] Liao, C.; Liu, F.; Kannan, K. *Environmental Science & Technology* **2012**, 46, 6515-6522.

[25] Liu, J.; Zhang, L.; Lu, G.; Jiang, R.; Yan, Z.; Li, Y. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2021**, 208, 111481.

- [26] Danzl, E.; Sei, K.; Soda, S.; Ike, M.; Fujita, M. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2009**, *6*(4), 1472-1484.
- [27] Herrero, Ó.; Aquilino, M.; Sánchez-Argüello, P.; Planelló, R. *PLoS One*. **2018**, *13*(2), e0193387.
- [28] Chen, D.; Kannan, K.; Tan, H.; Zheng, Z.; Feng, Y.L.; Wu, Y.; Widelka, M. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 5438–5453.
- [29] Unsman, A.; Ahmad, M. *Chemosphere* **2016**, *158*, 131-142.
- [30] Wu, M., Pan, C., Chen, Z.; Jiang, L.; Lei, P.; Yang, M. *Environ Sci Pollut Res* **2017**, *24*, 6611–6621.
- [31] Wang, Q.; Chen, M.; Shan, G.; Chen, P.; Cui, S.; Yi, S.; Zhu, L. *Science of The Total Environment* **2017**, *598*, 814-820.
- [32] Huang, C.; Wu, L.H.; Liu, G.Q.; Shi, L.; Guo, Y. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2018**, *75*, 224–235.
- [33] Yamazaki, E.; Yamashita, N.; Taniyasu, S.; Lam, J.; Lam, P. K.S.; Moon, H.B.; Jeong, Y.; Kannan, P.; Achyuthan, H.; Munuswamy, N.; Kannan, K. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2015**, *122*, 565-572.
- [34] Chin, K.Y.; Pang, K.L.; Mark-Lee, W.F. *Int J Med Sci.* **2018**, *15*(10), 1043–1050.
- [35] Ješeta, M.; Crha, T.; Žáková, J.; Ventruba, P. *Ceska Gynekologie – Czech Gynaecol* **2019**, *84*, 161–165.
- [36] Liu, J.; Li, J.; Wu, Y.; Zhao, Y.; Luo, F.; Li, S.; Yang, L.; Moez E.K.; Dinu, I.; W. Martin, J.W. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 4, 2456–2463.
- [37] Ferguson, K.K.; Lan, Z.; Yu, Y.; Mukherjee, B.; McElrath, T.F.; Meeker, J.D. *Environment International* **2019**, *13*, 104903.
- [38] Inadera, H. *Int J Med Sci.* **2015**, *12*(12), 926–936.

- [39] Acaroz, U.; Ince, S.; Arslan-Acaroz, D.; Gurler, Z.; Demirel, H.H.; Kucukkurt, I.; Eryavuz, A.; Kara, R.; Varol, N.; Zhu, K. *Toxicology Research* **2019**, *8*, 2, 262–269.
- [40] Anet, A.; Olakkaran, S.; Purayil, A.K.; Puttaswamygowda, G.H. *Journal of Hazardous Materials* **2019**, *370*, 42-53.
- [41] Liu, Y.; Imlay, J.A. *Science* **2013**, *339*, 6124, 1210-1213.
- [42] Burgos-Aceves, M.A.; Abo-Al-Ela, H.G.; Faggio, C. *Journal of Hazardous Materials* **2021**, *419*, 126426.
- [43] Kim, J.A.; Kim, M.J.; Choi, J.Y.; Park, Y.S.; Kim, J.H.; Choi, C.Y. *Fish and Shellfish Immunology* **2024**, *144*, 109277.
- [44] Seyoum, A.; Pradhan, A. *Science of The Total Environment*, **2019**, *654*, 969-977.
- [45] Xu, H.; Cao, W.; Sun, H.; Zhang, S.; Li, P.; Jiang, S.; Zhong, C. *Front. Mar. Sci* **2021**, *8*, 2296-7745.
- [46] Yurdakok-Dikmen, B.; Turgut, Y.; Gunal, A.Ç.; Uyar, R.; Kuzukiran, O.; Filazi, A.; Erkoc, F. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* **2020**, *56*, 783–79.
- [47] Gomez, I.D.L.; Gazo, I.; Nabi, D.; Besnardeau, L.; Hebras, C.; McDougall, A.; Dumollard, R. *Aquatic Toxicology* **2019**, *216*, 105314.
- [48] Seoane, M.; Cid, Á.; Herrero, C.; Esperanza, M. *Ecotoxicology* **2021**, *30* (1), 142-153.
- [49] Zeidi, A.; Sayidi, M.H.; Banaee, M.; Rezaei, M.R.; Gholamhosseini, A. *International Journal of Aquatic Biology* **2022**, *10*, No.4.
- [50] Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M.; Karademir, S.E. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 26, 7970–7981
- [51] Crapo, J.D.; McCord, M.; Fridovich, I. *Methods Enzymol.* **1978**, *53*, 382-393

- [52] Aebi, H. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121-126
- [53] Smith, I.K.; Vierheller, T.L.; Thorne, C.A. *Anal. Biochem.* **1988**, *17*, 408-413
- [54] Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130-7139
- [55] Oliveira, H.M.; Pinheiro, A.Q.; Fonseca, A.J.M.; Cabrita, A.R.J.; Maia, M.R.G. *MethodsX* **2019**, *6*, 246-258
- [56] Bradford, M.M. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, Issues 1–2, 248-254
- [57] Czarny-Krzyminska, K.; Krawczyk, B.; Szczukocki, D. *Chemosphere* **2023**, *315*, 137763.
- [58] Zhang, Y.; Mi, K.; Xue, W.; Wei, W.; Yang, H. *Fish & Shellfish Immunology* **2020**, *103*, 95-102.
- [59] Wang, Q.; Wang, L.; Han, R.; Yang, L.; Zhou, Q.; Huang, X. *Environ. Toxicol. Chem.* **2015**, *34* (5), 1127-1133.
- [60] Park, J.C.; Lee, M.C.; Yoon, D.S.; Han, J.; Kim, M.; Hwangc, U.K.; Jungb, J.H.; Lee, J.S. *Aquatic Toxicology* **2018**, *199*, 21–29.
- [61] Jenzri, M.; Gharred, C.; Bouraoui, Z.; Guerbej, H.; Jebali, J.; Gharred, T. *Marine Environmental Research* **2023**, *188*, 106032.
- [62] Uçkun, M. *Environmental Science and Pollution Research* **2022**, *29*, 25194–25208.
- [63] Fabrello, J.; Ciscato, M.; Munari, M.; Vecchiatti, A.; Roverso, M.; Bogialli, S.; Matozzo, V. *Marine Environmental Research* **2023**, *192*, 106228.
- [64] Peng, Y.Q.; Wang, M.J.; Chen, H.G.; Chen, J.H.; Gao, H.; Huang, H.H. *Journal of Crustacean Biology* **2018**, *38*(4), 489–496.
- [65] Jemec, A.; Tišler, T.; Erjavec, B.; Pintar, A. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2012**, *86*, 213–218.
- [66] Yang, H.; Hou, G.; Zhang, L.; Ju, L.; Liu, C. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2017**, *167*, 128-135.