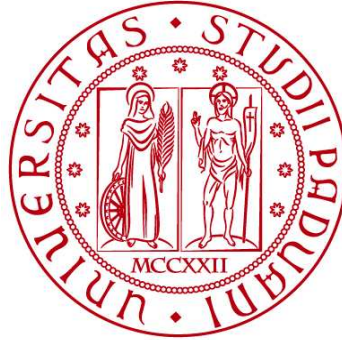


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea Magistrale in BIOLOGIA SANITARIA



TESI DI LAUREA

**VALUTAZIONE DEL RISCHIO
ECOTOSSICOLOGICO IN MOLLUSCHI BIVALVI
ALIMENTATI CON MICROALGHE ESPOSTE AD
ANALOGHI DEL BISFENOLO A**

Relatore: Prof. Valerio Matozzo
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott. Jacopo Fabrello
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Michela Dalla Fontana
Matricola 2053199

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

“È il tempo che hai perduto per la tua rosa che ha fatto la tua rosa così importante”

Il piccolo principe – Antoine De Saint Exupéry –

A mio nonno Virginio,
so che oggi,
come ogni giorno,
sarai con me anche da lassù

Abstract

Sebbene la presenza di frammenti di plastica in ambiente fosse già nota da tempo, è solo di recente che le microplastiche hanno suscitato un crescente interesse da parte della comunità scientifica (Alberghini et al., 2022). Ad oggi, però, solo pochi studi si sono concentrati sugli additivi plastici, ovvero sostanze chimiche che sono incorporate nella plastica e dalla quale possono essere poi rilasciate (Hermabessiere et al., 2017). Tra gli additivi plastici di maggior interesse spiccano, in particolar modo, i bisfenoli. Il capostipite della famiglia è il bisfenolo A (BPA), un plastificante comune utilizzato nella produzione di policarbonato e resine epossidiche, che viene considerato estremamente dannoso in quanto ritenuto un interferente endocrino sia per l'uomo che per altri animali. In seguito alla scoperta del trasferimento del BPA lungo la catena alimentare, nel 2010 sono state messe in atto importanti restrizioni che ne limitano il suo utilizzo. Oggi, altri analoghi del BPA, come il BPS, il BPF e il BPAF, vengono utilizzati come suoi sostituenti, ma la loro eco-tossicità è ancora sconosciuta (Fabrello and Matozzo, 2022).

Lo scopo del presente elaborato è stato, pertanto, quello di valutare il potenziale effetto ecotossicologico in molluschi bivalvi alimentati con microalghe precedentemente esposte ad analoghi del BPA.

INDICE

1. Introduzione	1
1.1 I bisfenoli	2
1.1.1 Il bisfenolo A	5
1.1.2 Il bisfenolo S	7
1.1.3 Il bisfenolo F	8
1.1.4 Il bisfenolo AF	9
2. Scopo della tesi	11
3. Materiali e metodi	13
3.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	13
3.2 <i>Ruditapes philippinarum</i>	15
3.3 Prelievo dei tessuti	18
3.4 Stima del THC	18
3.5 Saggio di proliferazione cellulare (XTT)	19
3.6 Saggio per l'attività della fosfatasi alcalina	19
3.7 Saggio per l'attività della fosfatasi acida	20
3.8 Saggio CUPRAC	20
3.9 Saggio per l'attività della superossido dismutasi (SOD)	21
3.10 Saggio per l'attività della catalasi (CAT)	21
3.11 Saggio per l'attività della glutatione reduttasi (GR)	22
3.12 Saggio per la perossidazione lipidica (TBARS)	22
3.13 Saggio dei gruppi carbonilici proteici (PCC)	23
3.14 Analisi delle proteine totali	24
3.15 Analisi statistica	24
4. Risultati	24
4.1 THC	24
4.2 Proliferazione cellulare	25
4.3 Attività della fosfatasi alcalina nell'emolinfa	26
4.4 Attività della fosfatasi alcalina nel lisato di emociti	27
4.5 Attività della fosfatasi acida nell'emolinfa	27

4.6	Attività della fosfatasi acida nel lisato di emociti	28
4.7	Risultati del saggio CUPRAC nella branchia	29
4.8	Risultati del saggio CUPRAC nella ghiandola digestiva	29
4.9	Attività della SOD nella branchia	30
4.10	Attività della SOD nella ghiandola digestiva	31
4.11	Attività della CAT nella branchia	31
4.12	Attività della CAT nella ghiandola digestiva	32
4.13	Attività della GR nella branchia	33
4.14	Attività della GR nella ghiandola digestiva	33
4.15	Perossidazione lipidica nella branchia	34
4.16	Perossidazione lipidica nella ghiandola digestiva	35
4.17	Risultati del saggio PCC nella branchia	35
4.18	Risultati del saggio PCC nella ghiandola digestiva	36
5.	Discussione e conclusioni	37
5.1	Effetti sugli emociti	37
5.2	Stress ossidativo	41
6.	Bibliografia	47
7.	Appendice	52

1. INTRODUZIONE

Oggigiorno la plastica è un materiale che risulta essere praticamente indispensabile in quanto fornisce molti benefici alla società e all'economia. La combinazione di versatilità, duttilità e costi effettivi di produzione ha fatto sì che tale materiale venga usato in molte applicazioni della vita quotidiana. Pensiamo, ad esempio, ai contenitori per cibi e bevande, agli adesivi, alle fibre sintetiche, ai dispositivi medici, ai tessuti, agli imballaggi, alle costruzioni e a numerosi altri prodotti (Hahladakis et al., 2022).

Negli ultimi settant'anni c'è stato un marcato aumento nella produzione di plastica: siamo passati da circa 1,5 milioni di tonnellate negli anni '50 a circa 367 milioni di tonnellate nel 2020. Secondo le ultime stime, la quantità di plastica prodotta sarà destinata a duplicare entro il 2025 e, addirittura, a triplicare entro il 2050 (Alberghini et al., 2022).

La produzione di massa e il largo consumo della plastica hanno avuto come conseguenza l'accumulo di questo materiale negli ambienti naturali, con conseguente impatto negativo sul micro e macrobiota. È stato calcolato che solamente nel 2010 sono state prodotte circa 275 milioni di tonnellate di rifiuto plastico; di questo tra le 4,8 e le 12,7 milioni di tonnellate hanno raggiunto gli oceani (Alberghini et al., 2022).

Una volta disperse nell'ambiente, le plastiche sono esposte a radiazioni solari, raffreddamento, riscaldamento, siccità e pioggia, iniziando così a degradarsi e a frammentarsi creando le cosiddette microplastiche, ovvero particelle plastiche di dimensioni inferiori ai 5mm (Alberghini et al., 2022).

Negli ultimi anni si sta manifestando un'attenzione sempre più crescente nei confronti delle microplastiche, le quali, a causa della loro piccola taglia, possono essere ingerite da una vasta gamma di organismi marini come zooplancton, bivalvi o elminti ma anche da organismi appartenenti ai livelli trofici superiori come pesci e mammiferi marini, entrando quindi a far parte della catena alimentare (Hermabessiere et al., 2017). Le microplastiche, inoltre, possono trasferire

all'ambiente circostante sostanze chimiche presenti sulla loro superficie o additivi potenzialmente tossici (Hermabessiere et al., 2017).

Durante il processo di produzione del materiale plastico, infatti, vengono aggiunte intenzionalmente sostanze chimiche (catalizzatori, additivi e monomeri) che danno il via al processo di polimerizzazione e migliorano le proprietà e le funzionalità della plastica stessa. Tali sostanze prendono il nome di *IAS* (*intentionally added substances*). In aggiunta alle *IAS* possono essere presenti anche sostanze che non vengono aggiunte in maniera intenzionale (*NIAS*, *nonintentionally added substances*) sottoforma di impurità e di prodotti di degradazione. La lista di *IAS* e *NIAS* è lunghissima e molte di queste risultano essere pericolose per la salute umana (Hahladakis et al., 2022).

Tra le principali *IAS* che si ritrovano libere nell'ambiente spiccano in particolar modo i bisfenoli (BPs).

1.1 I bisfenoli

La famiglia dei bisfenoli si compone di decine di composti accumulati dalla presenza di due anelli fenolici uniti da un ponte idrocarburico che può essere diversamente sostituito a seconda dello specifico composto.

I bisfenoli sono poco solubili in acqua e la solubilità in solventi organici dipende dai differenti gruppi sostituenti. Il bisfenolo A, ad esempio, presentando due gruppi metilici nel carbonio centrale, è facilmente solubile in mezzi polari come eteri e alcoli, mentre bisfenoli con gruppi alifatici più ingombranti sono generalmente solubili in idrocarburi aromatici e alifatici (Figura 1).

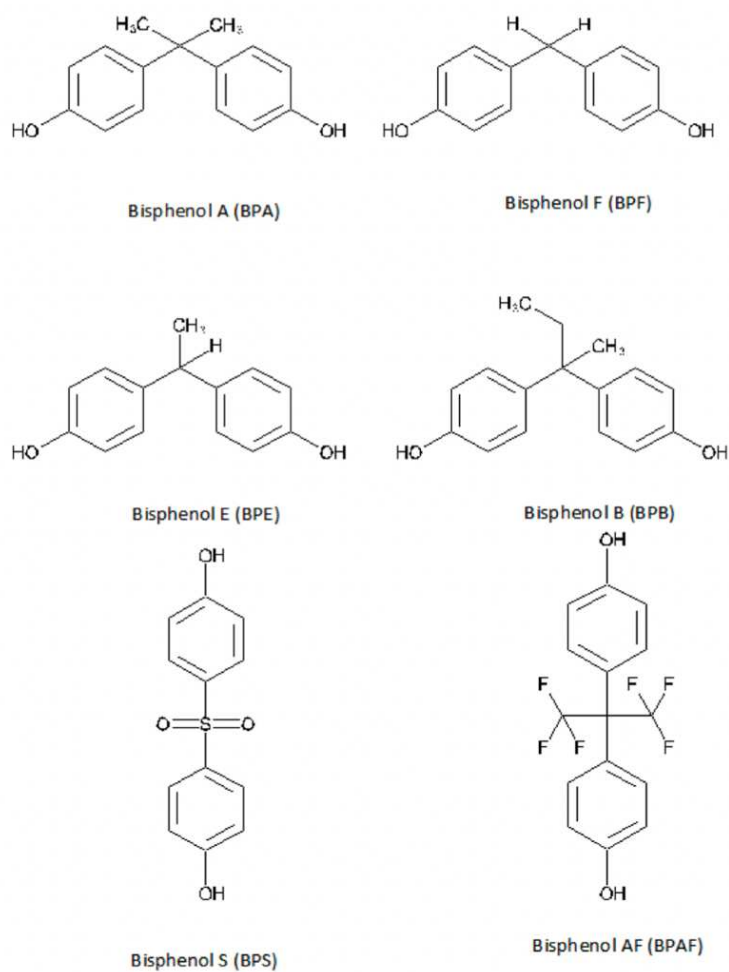


Figura 1: struttura chimica di alcuni bisfenoli (Andújar et al., 2019)

Tali composti sono ampiamente utilizzati nell'industria della plastica e la loro presenza è stata rilevata in numerosi comparti ambientali: dalle acque, ai sedimenti, all'aria e alla biomassa (Baralla et al., 2021).

Nonostante i bisfenoli siano più presenti nell'ambiente dulciacquicolo, sempre più spesso si osservano concentrazioni nell'ordine dei ng/L anche in ambiente marino (Tabella 1) (Fabrello and Matozzo, 2022).

	ACQUE MARINE (PAESE)	CONCENTRAZIONE ng/L
BPA	EST CINA	2.7-52 (media = 23)
	SINGAPORE	6-1493
	GRECIA	10.6-52.3 (media = 25)
BPS	EST CINA	0,12-11 (media = 3.7)
	SUD CINA	1.6-59.8
	BAIA DI TOKYO	ND-15 (media 8.5)
BPF	EST CINA	ND-0.65 (media = 0.31)
	SUD CINA	2.37-282
	BAIA DI TOKYO	ND-1470 (media = 373)
BPAF	EST CINA	ND-0.57 (media = 0.24)
	SUD CINA	0.40-3.59

Tabella 1: concentrazioni dei bisfenoli in ambiente marino (Fabrello and Matozzo, 2022)

Per tale motivo i bisfenoli sono attualmente considerati tra i principali contaminanti emergenti e sono sempre di più gli studi condotti con lo scopo di identificare le possibili minacce per l'ambiente e gli animali, uomo compreso (Baralla et al., 2021).

In seguito a diversi studi svolti sia su animali che sull'uomo è stato osservato che queste sostanze esercitano molteplici effetti in quanto sono in grado di interagire sia con i recettori di estrogeni che androgeni, interrompendo o alterando le normali funzioni del sistema endocrino (Kim et al., 2019). Per questo motivo il BPA e il BPS sono catalogati come endocrine disrupting chemical (EDC) dall'ECHA (European Chemicals Agency), mentre il BPF e il BPAF sono considerati, ad oggi, sostanze con potenziale effetto tossico (<https://echa.europa.eu/hot-topics/bisphenols>).

Elevati livelli di bisfenoli sono stati individuati in fluidi corporei umani quali urina, siero, tessuto placentare, sangue del cordone ombelicale e latte materno (Kim et al., 2019). Studi epidemiologici hanno dimostrato che l'esposizione della popolazione umana e animale ai bisfenoli aumenta il rischio di sviluppare malattie coronariche, disturbi neurologici e metabolici, inclusi obesità e diabete.

L'esposizione continua ai bisfenoli ha causato effetti dannosi anche sulla riproduzione e sullo sviluppo delle reti neurali (Kim et al., 2019).

La presenza di bisfenoli negli organismi viventi è stata messa in relazione anche all'aumentata produzione di ROS, all'incremento della perossidazione lipidica e ad un'alterata segnalazione cellulare (Kim et al., 2019).

1.1.1 Il bisfenolo A

Il bisfenolo A (BPA), nome comune del 2,2-bis(4-idrossifenil)propano, è il capostipite della famiglia dei bisfenoli in quanto è stato uno dei primi ad essere sintetizzato e da cui sono derivati tutti gli altri; ancora oggi è il maggiormente prodotto. Il BPA è un composto organico di sintesi che deriva dalla condensazione, in condizioni acide o basiche e a temperatura ambiente, di due gruppi fenolici con una molecola di acetone. Il prodotto di reazione è una molecola costituita da due anelli fenolici uniti da un carbonio metilico a cui sono legati, a loro volta, due gruppi metilici (Figura 2) (Hahladakis et al., 2022).

Di seguito sono elencate alcune proprietà chimico-fisiche del BPA (Tabella 2) (Chen et al., 2016):

PROPRIETÀ	VALORE
FORMULA MOLECOLARE	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
MASSA MOLECOLARE (UMA)	228.29
TEMPO DI EMIVITA (GIORNI)	37,5 in acqua, 75 nel suolo, 337,5 nel sedimento

Tabella 2: proprietà chimico-fisiche del BPA

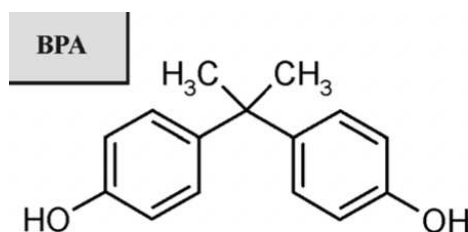


Figura 2: struttura chimica del BPA (Frankowski et al., 2020)

La storia del BPA inizia a partire dal 1891, quando il chimico russo Aleksandr Dianin sintetizzò per la prima volta la molecola. Da allora è diventato una delle molecole chimiche più utilizzate al mondo, con una produzione globale di oltre 8 tonnellate all'anno (Baralla et al., 2021). Grazie alla sua elevata versatilità, il BPA viene usato nella fabbricazione del policarbonato e delle resine epossidiche che si trovano in numerosi oggetti, inclusi computer e cellulari, ma anche biberon, tubazioni dell'acqua, materiali da laboratorio e ospedalieri e contenitori per cibi e bevande (Baralla et al., 2021).

Come molte altre sostanze sintetiche, che inizialmente si pensavano essere relativamente innocue e solo successivamente si scoprirono essere tossiche, l'esteso uso del BPA e il suo continuo rilascio in ambiente hanno sollecitato gli scienziati a investigarne i suoi potenziali effetti avversi. L'interesse sui potenziali effetti tossici del BPA crebbe notevolmente a partire dal 2010, quando il Governo canadese vietò per la prima volta il suo utilizzo nella fabbricazione dei biberon (Baralla et al., 2021). Seguendo l'esempio del Canada anche l'Unione Europea, gli Stati Uniti e alcuni Paesi dell'Asia (Cina, Malesia, Filippine e Taiwan) decisero di vietarne l'uso nella costruzione dei biberon (Baralla et al., 2021).

Nel 2015, l'EFSA (European Food Safety Authority) ha abbassato il valore di assunzione giornaliera tollerabile (TDI) del BPA da 50 µg/kg di peso corporeo/giorno a 4 µg/kg di peso corporeo/giorno. Le restrizioni sono state implementate anche per l'uso del BPA nella carta termica e negli imballaggi alimentari (Baralla et al., 2021). Successivamente, nel 2017 il BPA è stato classificato come "sostanza estremamente pericolosa" dall'Agenzia Europea delle Sostanze Chimiche (ECHA) e le sue proprietà di interferente endocrino vengono studiate e documentate tutt'oggi in tutto il mondo. Inoltre, è stato riscontrato che il BPA presenta una tossicità multiorgano e rappresenta un rischio per la salute del sistema riproduttivo e del sistema nervoso nonché aumenta la probabilità di sviluppare tumori, malattie metaboliche, malattie cardiovascolari e stress ossidativo (Baralla et al., 2021).

A causa della sua elevata tossicità, la presenza del BPA nell'ambiente che ci circonda viene continuamente monitorata. Negli ambienti acquatici, ad esempio,

le ultime stime confermano la presenza di questa molecola con una concentrazione media compresa tra le centinaia di ng/L e le decine di µg/L, superando talvolta anche il valore PNEC (Predicted no-effect concentration, Prevedibile Concentrazione Senza Effetti) di 1500 ng/L (PNEC = 150 ng/L nel caso dell'ambiente marino) (Fabrello and Matozzo, 2022).

Dato l'aumento delle normative che regolano l'uso del BPA, i produttori di polycarbonato e resine epossidiche hanno spostato la loro attenzione verso sostanze alternative strutturalmente simili al BPA note con il termine di analoghi del BPA. In questo elaborato parleremo in particolar modo dei bisfenoli S, F e AF.

1.1.2 Il bisfenolo S

Il bisfenolo S (BPS), nome comune del bis(4-idrossifenil)solfone, è costituito da due gruppi fenolici uniti da un gruppo funzionale solfonile (Figura 3).

Di seguito sono elencate alcune proprietà chimico-fisiche del BPS (Tabella 3) (Chen et al., 2016):

PROPRIETÀ	VALORE
FORMULA MOLECOLARE	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S
MASSA MOLECOLARE (UMA)	250,27
TEMPO DI EMIVITA (GIORNI)	15 in acqua, 30 nel suolo, 135 nel sedimento

Tabella 3: proprietà chimico-fisiche del BPS

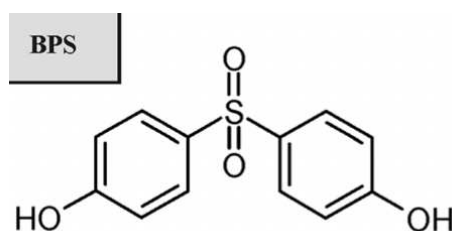


Figura 3: struttura chimica del BPS (Frankowski et al., 2020)

Il BPS ha il vantaggio di possedere una stabilità alla luce e al calore che può essere comparata a quella del BPA, proprietà che ha fatto sì che tale molecola fosse

introdotta in varie applicazioni industriali come un'importante alternativa al suo capostipite (Qiu et al., 2019).

Il BPS è stato sintetizzato per la prima volta nel 1869 come colorante e il suo uso come sostituto del BPA si è visto solo a partire dagli anni 2000. Poiché l'utilizzo del BPS non è regolamentato, è difficile specificare tutti i prodotti che lo contengono. Generalmente il BPS è usato come monomero nei polimeri sintetici e nelle resine epossidiche; quindi, lo ritroviamo in molti prodotti di uso quotidiano come plastiche, rivestimenti e confezioni di lattine per alimenti, biberon e giocattoli, materiali odontoiatrici e prodotti per la cura personale. Il BPS, ad esempio, è il principale analogo che viene aggiunto alla carta termica per lo sviluppo del colore in sostituzione del BPA (Wu et al., 2018).

Secondo l'Agenzia Europea del Farmaco (ECHA) siamo ampiamente esposti a questa sostanza. Si è stimato che nel 2015, in Europa, il tasso di produzione e importazione del BPS abbia superato le 10 000 tonnellate (Wu et al., 2018).

Come sostituto del BPA, il BPS è considerato il più sicuro. Ma questo può essere in parte dovuto alla mancanza di dati sufficienti per supportare la valutazione del rischio, in particolare la sua tossicità a basse dosi di esposizione. Sebbene i dati siano limitati, alcuni studi hanno documentato che in realtà il BPS potrebbe essere equamente o addirittura più dannoso del BPA. Ad esempio, studi indicano che il BPS causa gli stessi effetti del BPA sui recettori per gli estrogeni e per gli androgeni sollevando la preoccupazione sulla sicurezza del BPS come "sostituto sicuro" (Wu et al., 2018).

1.1.3 Il bisfenolo F

Il bisfenolo F (BPF), nome comune del bis(4-idrossifenil)metano, è costituito da due gruppi fenolici connessi da un metilene (Figura 4).

Di seguito sono elencate alcune proprietà chimico-fisiche del BPF (Tabella 4) (Chen et al., 2016):

PROPRIETÀ	VALORE
FORMULA MOLECOLARE	C ₁₃ H ₁₂ O ₂
MASSA MOLECOLARE (UMA)	200,23
TEMPO DI EMIVITA (GIORNI)	15 in acqua, 30 nel suolo, 135 nel sedimento

Tabella 4: proprietà chimico-fisiche del BPF

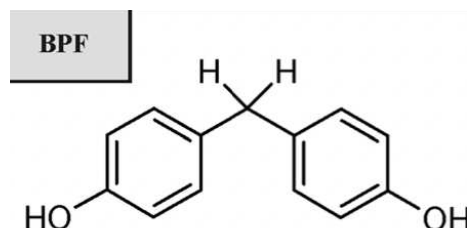


Figura 4: struttura chimica del BPF (Frankowski et al., 2020)

Il BPF è sempre più utilizzato nella sintesi delle resine epossidiche a causa della bassa viscosità e della migliore resistenza ai solventi rispetto al BPA. Per questo motivo il BPF ha trovato una vasta gamma di applicazioni nel settore industriale e sta gradualmente sostituendo il BPA (Usman et al., 2019). Tale molecola, quindi, si trova spesso in imballaggi alimentari, rivestimenti di tubazioni, prodotti odontoiatrici, pavimentazioni industriali, boiacche, vernici, lacche, plastiche e adesivi (Usman et al., 2019).

Il BPF è anche il più importante contaminante presente nei prodotti per la cura personale ed è stato trovato all'interno di bevande ed *energy drinks*, cibi in scatola, pasti già pronti e latte ad uso commerciale. Il BPF è considerato, infatti, il contaminante predominante della famiglia dei bisfenoli nei prodotti alimentari, con una concentrazione pari al 17% del totale dei bisfenoli (Usman et al., 2019).

1.1.4 Il bisfenolo AF

Il bisfenolo AF (BPAF), nome comune del 2,2-bis(4-idrossifenil)-1-fenil-etano, è un analogo del BPA in cui i due gruppi metilici centrali sono stati sostituiti da due gruppi trifluorometilici (Figura 5).

Di seguito sono elencate alcune proprietà chimico-fisiche del BPF (Tabella 5) (Chen et al., 2016):

PROPRIETÀ	VALORE
FORMULA MOLECOLARE	C ₁₅ H ₁₀ F ₆ O ₂
MASSA MOLECOLARE (UMA)	336,233
TEMPO DI EMIVITA (GIORNI)	180 in acqua, 360 nel suolo, 1620,8 nel sedimento

Tabella 5: proprietà chimico-fisiche del BPAF

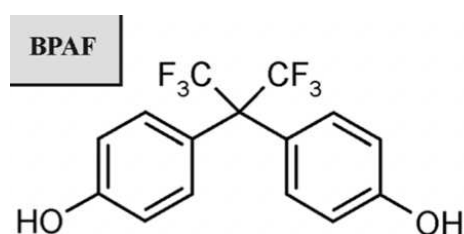


Figura 5: struttura chimica del BPAF (Frankowski et al., 2020)

Il BPAF è un altro sostituto emergente del BPA che viene ampiamente utilizzato a livello industriale per la sintesi di elastomeri, fibre ottiche e dispositivi elettronici. Tra tutti gli analoghi del BPA, il BPAF sembra essere quello più tossico a causa della presenza dei gruppi radicali idrofobici (-CF₃). Alcuni studi, infatti, hanno dimostrato che il BPAF si lega fortemente ai recettori estrogenici, causando effetti avversi sulla riproduzione e sullo sviluppo di diversi organismi (Baralla et al., 2021). Tale molecola, inoltre, ha mostrato neurotossicità interrompendo l'attivazione della microglia e inducendo la morte cellulare (Baralla et al., 2021).

2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato di valutare gli effetti di alcuni analoghi del bisfenolo A sul mollusco bivalve *Ruditapes philippinarum* (Figura 6) alimentato con microalghe della specie *Phaeodactylum tricornutum* (Figura 7) precedentemente esposte a BPS, BPF, BPAF e alla loro miscela.



Figura 6: esemplare di *Ruditapes philippinarum*

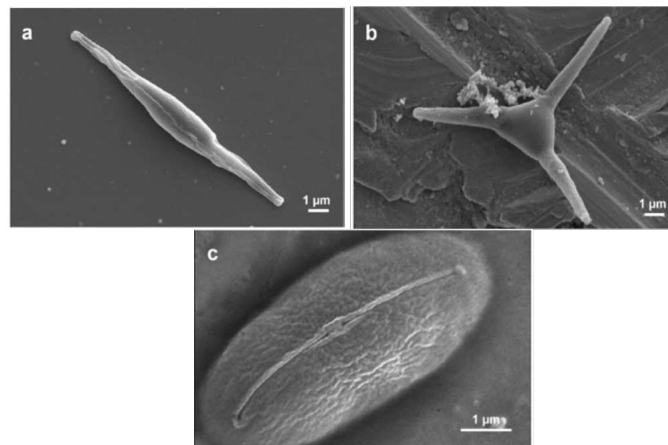


Figura 7: immagini al microscopio elettronico a scansione dei morfotipi fusiforme (a), triradiato (b) e ovoidale (c) di *Phaeodactylum tricornutum* (Francius et al., 2008)

Phaeodactylum tricornutum è comunemente usata nei test di tossicità secondo il protocollo standardizzato ISO 10253:2006. Molti autori considerano questa microalga come un modello biologico di riferimento per testare prodotti chimici inorganici e organici. Ad esempio, negli ultimi anni *P. tricornutum* è stata utilizzata per valutare numerosi contaminanti emergenti come nanomateriali ingegnerizzati

e prodotti farmaceutici, campioni di acque superficiali, profonde e sedimenti (Libralato et al., 2016).

Ruditapes philippinarum (Adams & Reeve, 1850) è un mollusco bivalve fossorio appartenente alla famiglia dei Veneridi, conosciuto comunemente con il nome di “vongola filippina”.

In generale, i molluschi bivalvi si nutrono di fitoplancton, di microrganismi vivi o morti e di particelle organiche presenti in sospensione nella colonna d'acqua o nei sedimenti. Come animali filtratori, sono in grado di filtrare grandi volumi di acqua trattenendo un'elevata quantità di particelle in essa contenute. Questa grande capacità di filtrazione consente loro di concentrare e accumulare nei tessuti una varietà di sostanze, rendendoli adatti al biomonitoraggio ambientale nonché organismi modello per la contaminazione microbiologica e da biotossine (Baralla et al., 2021).

L'uso dei bivalvi, in particolare delle vongole, come specie sentinella presenta molti vantaggi: sono globalmente presenti in popolazioni numerose e sono sedentari, quindi altamente suscettibili all'inquinamento idrico di un luogo specifico. Inoltre, molti animali come pesci, stelle marine, uccelli e crostacei si nutrono proprio di bivalvi, i quali rappresentano quindi un anello importante nella catena alimentare. Infatti, in quanto consumatori primari, i molluschi bivalvi possono trasferire gli inquinanti ai livelli trofici più elevati (Baralla et al., 2021).

Quindi, al fine di valutare la possibile tossicità degli analoghi del bisfenolo A sui molluschi bivalvi alimentati con microalghe esposte agli analoghi del bisfenolo A, sono state condotte esposizioni controllate (7 e 14 giorni), al termine delle quali sono stati misurati biomarker indicativi di citotossicità, stress ossidativo e neurotossicità in tessuti target (emolinfa, branchie e ghiandola digestiva) dei molluschi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Phaeodactylum tricornutum*

Le microalghe sono alla base della catena alimentare acquatica e giocano, pertanto, un ruolo fondamentale nel mantenimento degli ecosistemi; sono considerate utili indicatori ambientali di qualità delle acque e vengono sempre più spesso utilizzate in saggi di tossicità (Seoane et al., 2021b).

Phaeodactylum tricornutum (K. Bohlin, 1897), in particolare, è un'alga unicellulare appartenente al phylum delle Bacillariophyta, comunemente note con il termine di diatomee. Le diatomee sono alghe unicellulari che vivono sia in ambienti marini che dulcicoli, caratterizzate dalla presenza di una parete cellulare di natura silicea chiamata frustulo. La forma dei frustuli varia notevolmente da specie a specie e generalmente si ritrova una notevole diversità a livello di nanostrutture, permettendone una più facile identificazione e classificazione (Francius et al., 2008).

P. tricornutum è una microalga molto diffusa nelle acque costiere ma la si ritrova spesso anche in laghi, bacini idrici e fiumi. Ad oggi ne sono stati descritti ben tre diversi morfotipi: ovoidale, fusiforme e triradiato. La diversa presenza dei singoli morfotipi non è ancora ben compresa ma sembra essere dovuta alle condizioni ambientali come intensità luminosa e disponibilità di nutrienti. La peculiarità di questa specie è che, all'opposto delle altre diatomee, presenta una parete cellulare povera in silicio. La forma ovoidale, infatti, rappresenta l'unico morfotipo in grado di sintetizzare un frustulo siliceo, mentre le altre due forme sono caratterizzate da una sostanziale assenza del frustulo e da una parete cellulare costituita prevalentemente da polisaccaridi, proteine e, in bassa percentuale, lipidi (Francius et al., 2008).

In questo studio il ceppo fusiforme di *P. tricornutum* (proveniente da Culture Collection of Algae at Göttingen University, SAG, Germany) è stato inizialmente acclimatato per 10 giorni nel medium di coltura F/2 (privo di contaminanti)

(Guillard, 1975), alla temperatura di 16°C, ad un'intensità luminosa di 40.5 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e con un fotoperiodo di 12:12 luce/buio. In seguito, partendo dalla beuta di acclimatazione, sono state preparate 5 ulteriori beute con un inoculo iniziale pari a 5×10^4 cellule/ml e un volume totale di 600ml a cui sono stati addizionati i diversi bisfenoli. Nello specifico sono state preparate 3 differenti soluzioni madre (1mg/l) sciogliendo il BPAF e il BPF in metanolo (in quanto sostanze apolari) e il BPS in acqua distillata (in quanto più polare). Il giorno stesso dell'inoculo delle 5 beute ad ognuna di esse (ad esclusione di quella impiegata come controllo) sono stati addizionati 180 μl di soluzione madre in modo da ottenere una concentrazione in beuta pari a 300 ng/l (concentrazione scelta sulla base dei dati presenti in letteratura sui livelli degli analoghi del BPA negli ecosistemi acquatici). In aggiunta nella quinta beuta sono stati addizionati tutti e tre i bisfenoli al fine di testare la miscela (MIX); in questo caso la concentrazione di ognuno dei 3 bisfenoli era pari a 100 ng/l. Di seguito è riportato uno schema riassuntivo dell'impianto sperimentale (Figura 8):

1. *BEUTA di controllo*: F/2 e inoculo
2. *BEUTA con BPAF*: F/2, inoculo e 180 μl di BPAF
3. *BEUTA con BPF*: F/2, inoculo e 180 μl di BPF
4. *BEUTA con BPS*: F/2, inoculo e 180 μl di BPS
5. *BEUTA con MIX*: F/2, inoculo, 60 μl di BPAF, 60 μl di BPF e 60 μl di BPS



Figura 8: colture algali utilizzate per lo studio

Le 5 tipologie di colture algali sono state usate come nutrimento delle vongole durante la loro fase di crescita stazionaria; inoltre, al fine di avere sufficiente cibo

per alimentare gli animali e di impiegare sempre colture algali con la medesima densità cellulare, durante tutto il tempo di esposizione delle vongole sono state periodicamente create ulteriori repliche delle 5 beute. Poiché in un precedente studio è stato dimostrato che la concentrazione di metanolo usata non altera la crescita e i parametri biochimici di *P. tricornutum* (Fabrello et al., 2023) il controllo con solo metanolo è stato omissso dal piano sperimentale.

3.2 *Ruditapes philippinarum*

Originaria della costa asiatica del Pacifico, *Ruditapes philippinarum* è il secondo bivalve più coltivato negli ambienti di acquacoltura di tutto il mondo (Frederick S.B. Kibenge, 2022). Questa specie, come gli altri molluschi bivalvi, si nutre utilizzando dei sifoni che incanalano l'acqua all'interno dell'animale. La sacca dei visceri contiene diversi organi, tra cui le branchie, la ghiandola digestiva e il cuore. L'acqua incanalata dal sifone inalante viene filtrata dalle branchie che trattengono il materiale organico presente in sospensione, il quale viene successivamente indirizzato alla ghiandola digestiva, dove inizia il processo di digestione vero e proprio (Frederick S.B. Kibenge, 2022).

R. philippinarum dispone di meccanismi di detossificazione utili ad alleviare le conseguenze dell'esposizione a composti tossici. Durante il processo di detossificazione, infatti, enzimi come le carbossilesterasi (CE) convertono i composti tossici in molecole più idrofile per facilitarne l'eliminazione. In una seconda fase, la glutazione S-transferasi (GST) coniuga i metaboliti degli xenobiotici con il glutatione per convertirli in molecole ancora più idrofile e meno reattive (Rios-Fuster et al., 2022).

Con il processo di detossificazione, però, possono essere prodotte specie reattive dell'ossigeno (ROS). A fronte di ciò, i bivalvi hanno sviluppato un complesso sistema antiossidante composto da enzimi come superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutazione perossidasi (GPX) e glutazione reduttasi (GR). Tuttavia, se la produzione di ROS supera le capacità detossificanti del sistema antiossidante, i ROS possono originare danno ossidativo danneggiando così diverse

macromolecole, come proteine, DNA e lipidi e il livello dei prodotti ossidati di queste macromolecole può essere così utilizzato come biomarker di danno ossidativo (Rios-Fuster et al., 2022).

Il sistema circolatorio di *R. philippinarum* è aperto e costituito da emolinfa, le cui cellule sono gli emociti. Sebbene gli emociti siano coinvolti in vari processi fisiologici, tra cui la riparazione dei tessuti, la produzione della conchiglia e la nutrizione, sono stati studiati principalmente per il loro coinvolgimento nell'immunità e nell'eliminazione dei patogeni (Donaghy et al., 2009). Gli emociti sono, infatti gli effettori immunitari delle vongole: partecipano sia alle difese cellulari che a quelle umorali. Si tratta di cellule circolanti che agiscono come cellule sentinella, scansionando l'ambiente circostante per rilevare materiale estraneo e indurre risposte immunitarie efficienti (Donaghy et al., 2009). Considerando l'importante ruolo degli emociti nelle risposte immunitarie dei bivalvi, è importante studiare gli effetti avversi dei contaminanti sulla funzionalità di queste cellule, per definire una situazione di eventuale immunosoppressione negli animali, da cui potrebbe scaturire una maggior suscettibilità alle malattie e una ridotta capacità di sopravvivenza (Matozzo et al., 2012).

Per questo studio gli esemplari di *R. philippinarum* (lunghezza media 36,7 mm) sono stati prelevati nel febbraio del 2023 in zone di concessione nei pressi di Chioggia e sono stati poi acclimatati per 7 giorni all'interno di vasche contenenti acqua di mare a 16°C e un fondo sabbioso. In seguito alla stabulazione, i bivalvi sono stati trasferiti in 10 acquari di vetro, 2 per ognuna delle 5 condizioni sperimentali testate, riempiti con 30 l di acqua marina e privi di fondo sabbioso (al fine di evitare interferenze nella biodisponibilità dei contaminanti a causa della sabbia). Durante le due settimane di esposizione, l'acqua è stata rinnovata ogni due giorni e contestualmente gli animali di ciascuna vasca sono stati nutriti con una sospensione di *P. tricornutum* precedentemente contaminato con i bisfenoli (come descritto precedentemente). Nello specifico, da ognuna delle 5 beute sono stati prelevati 300 ml di coltura algale in condizioni di sterilità impiegando una cappa biologica. Al fine di trasferire i bisfenoli solo attraverso le microalghe e non

mediante il mezzo di coltura F/2, le diverse sospensioni algali sono state centrifugate a 4000 rpm a temperatura ambiente per 10 minuti impiegando un'ultracentrifuga modello Avant J-25 montante un rotore JLA 10.500. Le condizioni di ultracentrifugazione sono state precedentemente impostate e validate affinché le microalghe non subissero danni. Il supernatante risultante è stato eliminato, al contrario il pellet microalgale è stato immediatamente risospeso con un pari volume di acqua di mare filtrata mediante un filtro di nitrocellulosa avente una maglia di 0.45 μm . Successivamente, la sospensione algale così ricostituita è stata impiegata come nutrimento per le vongole. Durante la prima settimana di esposizione sono stati forniti 150 ml di sospensione microalgale per vasca; tuttavia, in seguito al prelievo dei tessuti animali al settimo giorno di esposizione, durante la seconda settimana è stato dimezzato sia il volume dell'acqua delle vasche che il volume di sospensione algale fornito come nutrimento (75 ml) al fine di mantenere lo stesso rapporto tra numero di animali, volume di acqua disponibile e volume di sospensione algale per animale.

Il seguente schema riassume il design sperimentale adottato (Tabella 6):

Settimana di esposizione	Vasca	Volume di acqua per vasca	Esemplari di <i>R. philippinarum</i> per vasca	Tipologia di beuta impiegata	Volume di sospensione algale usata
1	Vasca CONTROLLO (1-2)	30 l	40	Controllo	150 ml
1	Vasca BPAF (3-4)	30 l	40	BPAF	150 ml
1	Vasca BPF (5-6)	30 l	40	BPF	150 ml
1	Vasca BPS (7-8)	30 l	40	BPS	150 ml
1	Vasca MIX (9-10)	30 l	40	MIX	150 ml
2	Vasca CONTROLLO (1-2)	15 l	20	Controllo	75 ml
2	Vasca BPAF (3-4)	15 l	20	BPAF	75 ml
2	Vasca BPF (5-6)	15 l	20	BPF	75 ml
2	Vasca BPS (7-8)	15 l	20	BPS	75 ml
2	Vasca MIX (9-10)	15 l	20	MIX	75 ml

Tabella 6: design sperimentale

3.3 Prelievo dei tessuti

Dopo 7 e 14 giorni di fornitura delle alghe contaminate sono stati prelevati 30 animali per ogni condizione (15 per vasca) al fine di prelevarne i tessuti.

I bivalvi prelevati da ogni condizione sperimentale per i due tempi sperimentali sono stati suddivisi in 5 pool da 6 animali ciascuno in modo da avere animali con dimensioni simili in ognuno dei pool creati (Figura 9):



Figura 9: esempio di suddivisione dei bivalvi in 5 pool da 6 animali ciascuno

Per ogni pool, l'emolinfa è stata prelevata dal muscolo adduttore anteriore mediante una siringa.

In seguito, da ogni animale di ogni pool sono state prelevate le branchie e la ghiandola digestiva che sono poi state raggruppate in modo da ottenere, come già detto, 5 pool da 6 animali ciascuno. I pool di tessuto sono stati poi suddivisi in aliquote per le diverse analisi. Le aliquote sono state congelate in azoto liquido e mantenute a -80°C fino al momento del loro impiego.

3.4 Stima del THC

La conta totale emocitaria (THC) è stata effettuata diluendo il campione di emolinfa 1:100 con una soluzione isotonica (COULTER ISOTON II diluent) e utilizzando un contatore di particelle Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter. I risultati sono espressi come n°emociti*10⁶/ml di emolinfa.

3.5 Saggio di proliferazione cellulare (XTT)

Per valutare la proliferazione cellulare è stato utilizzato un apposito kit commerciale: *Cell proliferation*, Kit II, Roche. Si tratta di un saggio colorimetrico per la quantificazione non radioattiva della proliferazione e della vitalità cellulare in cui il sale di tetrazolio (XTT) è convertito a formazano, di colore arancio, solo dalle cellule vitali. Questa riduzione è correlata alla produzione di NADPH attraverso la glicolisi; dunque, la quantità di colorante formazano che si forma correla direttamente con il numero di cellule metabolicamente attive presenti nel campione.

In dettaglio, dopo il prelievo, a 400 µl di emolinfa (emolinfa + emociti) sono stati aggiunti 200 µl della miscela composta da 5 ml di *XTT labeling reagent* e 100 µl di *electron-coupling reagent*, entrambi forniti dal kit. Il bianco conteneva 400 µl di acqua distillata pura e 200 µl della miscela di reazione. I campioni sono stati poi incubati al buio per 5 ore a temperatura ambiente e sono stati periodicamente mescolati. L'assorbanza dell'emolinfa è quindi letta allo spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono stati espressi come OD450/n° di emociti*10⁶.

3.6 Saggio per l'attività della fosfatasi alcalina

La fosfatasi alcalina è un enzima di membrana che lavora a pH basico (>7) rimuovendo gruppi fosfato da composti organici tramite idrolisi. Per valutare l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina è stato utilizzato il saggio proposto da Ross et al. (2000). Tale saggio prevede che i campioni di emolinfa vengano incubati con *p*-nitrofenil fosfato in tampone di bicarbonato di ammonio 100 mM con 1 mM di MgCl₂, a pH 7.8 e a 30°C. L'assorbanza è stata misurata contro il bianco a 405 nm a seguito di un periodo di incubazione di un'ora.

I risultati sono stati espressi come U fosfatasi alcalina/mg proteine, dove una unità (U) di attività è stata definita come la quantità di enzima richiesta per idrolizzare 1 µmole *p*-nitrofenolo in 1 minuto a pH 7.8 e a 30°C.

3.7 Saggio per l'attività della fosfatasi acida

La fosfatasi acida è un enzima lisosomiale che, al pari della fosfatasi alcalina, rimuove gruppi fosfato da composti organici tramite idrolisi. Al contrario della fosfatasi alcalina, però, lavora a pH acido (<7). Per valutare l'attività enzimatica della fosfatasi acida è stato utilizzato un kit commerciale (Acid Phosphatase Assay Kit, Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Tale saggio prevede che i campioni di emolinfa vengano incubati con *p*-nitrofenil fosfato in tampone citrato, a pH 4.8 e a 37°C. L'assorbanza è stata misurata contro il bianco a 405 nm a seguito di un periodo di incubazione di 10 minuti.

I risultati sono stati espressi come U fosfatasi acida/mg proteine, dove una unità (U) di attività è stata definita come la quantità di enzima richiesta per idrolizzare 1 µmole *p*-nitrofenolo in 1 minuto a pH 4.8 e a 37°C.

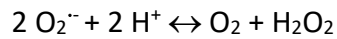
3.8 Saggio CUPRAC

Il livello di antiossidanti totali presenti sia nella branchia che nella ghiandola digestiva è stato quantificato secondo il metodo CUPRAC proposto da Apak et al. (2004). Il saggio si basa sulla riduzione del rame da Cu⁺⁺ a Cu⁺ causata dagli antiossidanti presenti nel campione. Il rame viene poi chelato dalla neocuproina, dando un complesso di colore arancione. Nello specifico i campioni di tessuto sono stati disgregati in tampone di omogeneizzazione (TRIS-HCl 10 mM, pH 7.6, KCl 0.15 M, saccarosio 0.5 M, inibitori di proteasi) mediante l'impiego del TissueLyser LT (Quiagen). Al termine di questo primo passaggio i campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm a 4°C per 30 minuti al fine di ottenere il supernatante.

Successivamente al tampone fosfato sono stati aggiunti la neocuproina e il supernatante. Dopo un'incubazione di 1 ora al buio, l'assorbanza è stata quantificata a 450 nm. L'aumento di assorbanza è quindi direttamente proporzionale al contenuto di antiossidanti nel campione. Infine, la capacità antiossidante totale è stata espressa come concentrazione mM di equivalenti di Trolox (un analogo della vitamina E)/ mg proteine.

3.9 Saggio per l'attività della superossido dismutasi (SOD)

L'enzima superossido dismutasi (SOD) è uno dei più importanti enzimi antiossidanti presenti negli organismi viventi. Tale enzima, infatti, catalizza la seguente reazione:



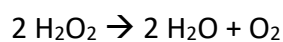
In altre parole, la SOD è coinvolta nella conversione dell'anione superossido in ossigeno molecolare e acqua ossigenata.

Dato che il radicale libero dell'ossigeno risulta essere molto instabile, l'attività catalitica della SOD richiede saggi di misurazione di tipo indiretto, costituiti da due componenti: un generatore di superossido e un rilevatore. In questo elaborato l'attività della SOD è stata valutata sia nelle branchie che nella ghiandola digestiva dei bivalvi mediante l'utilizzo del saggio dell'ipoxantina/xantina ossidasi proposto da Crapo et al. (1978). L'analisi è stata svolta in campioni di branchia e ghiandola digestiva; l'omogenizzazione e la centrifugazione sono state eseguite con le modalità già descritte in precedenza.

Brevemente, al tampone fosfato sono stati aggiunti, nell'ordine: ipoxantina, citocromo c, surnatante e xantina ossidasi. La xantina ossidasi funge da generatore di superossido ossidando l'ipoxantina; a sua volta l'anione superossido riduce il citocromo c. La SOD inibisce la riduzione del citocromo c. Tale reazione di ossidoriduzione è stata valutata attraverso l'aumento dell'assorbanza a 550 nm per 30 secondi impiegando uno spettrofotometro (Beckman Coulter 730). Infine, l'attività della SOD è stata espressa in U SOD/ mg proteine.

3.10 Saggio per l'attività della catalasi (CAT)

La catalasi (CAT) è un enzima antiossidante che catalizza la conversione del perossido di idrogeno (H_2O_2) ad acqua e ossigeno secondo la seguente reazione:



L'attività della CAT è stata misurata sia nella branchia che nella ghiandola digestiva utilizzando il saggio proposto da Aebi et al. (1984). L'omogenizzazione e la

centrifugazione sono state eseguite con le modalità già descritte in precedenza. Per lo svolgimento di questo saggio enzimatico, in cuvette in quarzo, sono stati aggiunti al tampone fosfato il supernatante e il substrato, ovvero il perossido di idrogeno. Il decremento di assorbanza è stato letto allo spettrofotometro a 240 nm per 30 secondi. L'attività di CAT è stata espressa, infine, in U CAT/ mg proteine.

3.11 Saggio per l'attività della glutatione reduttasi (GR)

La glutatione reduttasi (GR) è un enzima che converte il glutatione da stato ossidato (GSSG) a stato ridotto (GSH), andando così a ricostituire le riserve di GSH. Il GSH è un importante antiossidante il cui funzionamento si basa sulla presenza del NADPH. Quest'ultimo, funzionando da cofattore della GR, cede elettroni al GSSG permettendo la rigenerazione del GSH stesso:



Il metodo seguito in questa analisi è quello proposto da Smith et al. (1988), in cui la GR trasforma il GSSG in GSH impiegando NADPH. Successivamente il GSH originato reagisce spontaneamente con il substrato DTNB (5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) dando origine a TNB (5-thio (2-nitrobenzoic acid)). Il TNB viene rilevato grazie ad un incremento di assorbanza osservato a 412 nm. L'aumento di assorbanza è, quindi, direttamente proporzionale all'attività di GR.

L'analisi è stata svolta in campioni di branchia e ghiandola digestiva; l'omogenizzazione e la centrifugazione sono state eseguite con le modalità già descritte in precedenza. L'attività di GR è stata espressa, infine, in U GR / mg proteine.

3.12 Saggio per la perossidazione lipidica (TBARS)

La perossidazione dei lipidi è stimata attraverso la formazione di sostanze reattive all'acido tio-barbiturico (TBA), secondo il metodo di Buege e Aust (1978). Tale metodo prevede che la malondialdeide (MDA), uno dei principali prodotti della perossidazione lipidica, reagisca con il TBA a formare addotti MDA-2TBA noti con

il termine di TBARS. La presenza di TBARS induce una colorazione rosso-rosa al composto che viene letta allo spettrofotometro con una lunghezza d'onda pari a 532 nm. Questo test viene eseguito in condizioni di pH acido e alte temperature. L'analisi è stata svolta in campioni di branchia e ghiandola digestiva; l'omogenizzazione e la centrifugazione sono state eseguite con le modalità già descritte in precedenza. I risultati sono stati espressi come nmoli TBARS/ mg proteine.

3.13 Saggio dei gruppi carbonilici proteici (PCC)

Il danno ossidativo delle proteine è stato misurato attraverso la stima del contenuto di gruppi carbonilici delle proteine (PCC) proposto da Mecocci et al. (1998). Tale saggio prevede che la 2,4-dinitrofenil-idrazina (DNPH) reagisca con i gruppi carbonili proteici, che si formano in seguito ad eventi di danno ossidativo, a dare idrazone. Quest'ultimo ha un caratteristico assorbimento a 370 nm. L'analisi è stata svolta in campioni di branchia e ghiandola digestiva; l'omogenizzazione e la centrifugazione sono state eseguite con le modalità già descritte in precedenza.

Tutti i campioni sono, quindi, stati fatti reagire con DNPH e sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente sotto continua agitazione. In seguito, la proteina è stata fatta precipitare mediante l'aggiunta di acido tricloroacetico. Si sono eseguiti, poi, una serie di lavaggi con una soluzione di etanolo/etile acetato volti ad eliminare il surnatante e, con esso, il DNPH residuo che non ha reagito con le proteine. I campioni, infine, sono stati disciolti in guanidina cloruro e analizzati allo spettrofotometro. I risultati sono stati espressi come nmol gruppo carbonilico/mg proteina.

3.14 Analisi delle proteine totali

L'analisi del contenuto proteico totale, necessaria per la normalizzazione dei risultati dei saggi enzimatici, è stata determinata attraverso il metodo di Bradford (1976).

3.15 Analisi statistica

I risultati sono stati sottoposti alla verifica degli assunti per l'ANOVA, ovvero la distribuzione normale dei dati (Shapiro-Wilk's test) e l'omogeneità delle varianze (Bartlett's test). I risultati sono stati quindi analizzati mediante l'analisi della varianza a due vie (Two-way ANOVA), seguita dal test post-hoc di Fisher per il confronto a coppie. L'analisi statistica è stata realizzata con il software OriginPro 2023. I risultati sono stati espressi come media \pm errore standard (es) (n=5).

4. RISULTATI

4.1 THC

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.01$) dei fattori "tempo", "trattamento" ($p < 0.001$) e interazione "trattamento*tempo" ($p < 0.001$) sui valori di THC (Tabella 1A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dei valori di THC negli animali alimentati per 7 giorni con alghe esposte a BPAF e BPF, rispetto al controllo (Figura 10). Si nota, inoltre, una diminuzione statisticamente significativa dei valori di THC negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte a BPS, rispetto al controllo (Figura 10).

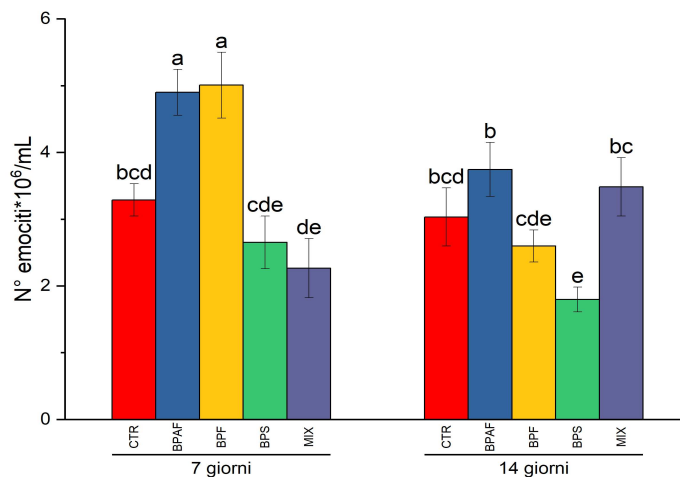


Figura 10: valori di THC, espressi come n° di emociti*(10⁶)/ml di emolinfa, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.2 Proliferazione cellulare

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.01$) dei fattori "tempo", "trattamento" e interazione "trattamento*tempo" sulla proliferazione cellulare (Tabella 2A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dei valori di proliferazione cellulare negli animali alimentati per 7 giorni con alghe esposte alla miscela di bisfenoli (MIX), rispetto al controllo (Figura 11). Si nota, inoltre, un aumento statisticamente significativo dei valori di proliferazione cellulare negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte a BPS, rispetto al controllo (Figura 11).

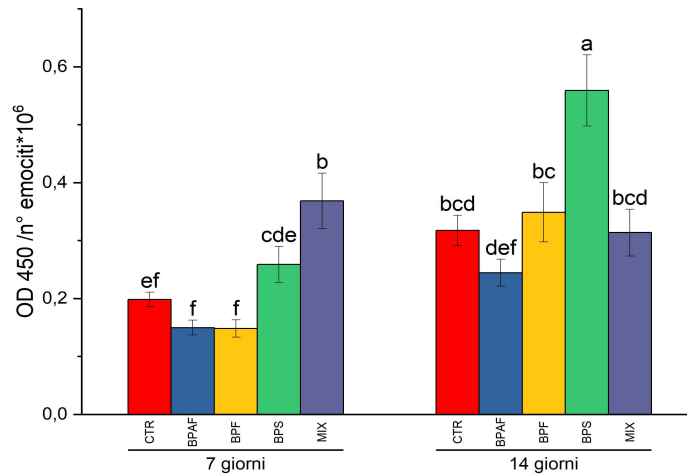


Figura 11: valori di proliferazione cellulare, espressi come OD450/n° di emociti*10⁶, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.3 Attività della fosfatasi alcalina nell'emolinfa

L'ANOVA a due vie e il confronto a coppie non hanno evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa tra il controllo e i trattamenti per quanto riguarda l'attività della fosfatasi alcalina nell'emolinfa priva di cellule (Tabella 3A-sezione Appendice; Figura 12).

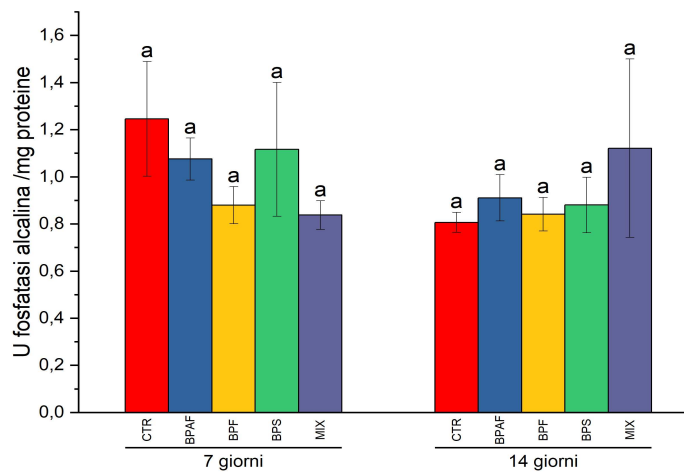


Figura 12: attività della fosfatasi alcalina nell'emolinfa, espressa come U fosfatasi alcalina/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.4 Attività della fosfatasi alcalina nel lisato di emociti

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.05$) dei fattori "tempo", "trattamento" e interazione "trattamento*tempo" sull'attività della fosfatasi alcalina nel lisato emocitario (Tabella 4A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato una diminuzione statisticamente significativa dell'attività della fosfatasi alcalina negli animali alimentati per 7 giorni con animali esposti a BPAF, BPS e alla miscela di bisfenoli (MIX), rispetto al controllo (Figura 13). Un aumento statisticamente significativo dell'attività della fosfatasi alcalina è stato registrato negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte a BPF, rispetto al controllo (Figura 13).

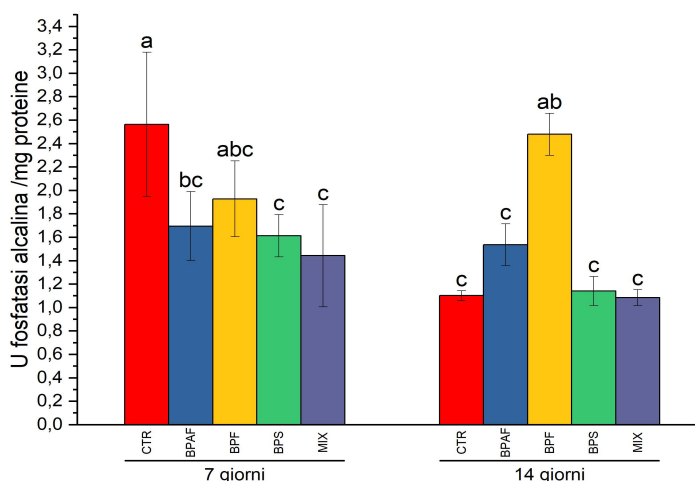


Figura 13: attività della fosfatasi alcalina nel lisato di emociti, espressa come U fosfatasi alcalina/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.5 Attività della fosfatasi acida nell'emolinfa

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.001$) dei fattori "tempo" e interazione "trattamento*tempo" ($p < 0.01$) sull'attività della fosfatasi acida nell'emolinfa priva di cellule (Tabella 5A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dell'attività della fosfatasi acida negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte a BPAF, rispetto al controllo (Figura 14).

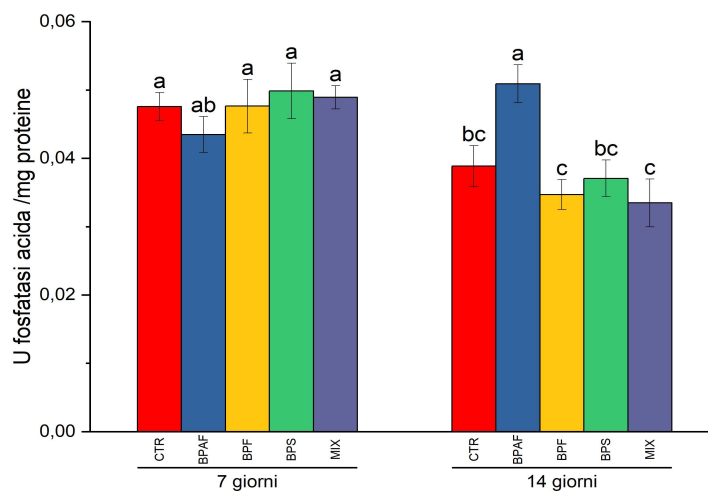


Figura 14: attività della fosfatasi acida nell'emolinfa, espressa come U fosfatasi acida/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.6 Attività della fosfatasi acida nel lisato di emociti

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.05$) solo del fattore "tempo" sull'attività della fosfatasi acida nel lisato emocitario (Tabella 6A-sezione Appendice; Figura 15).

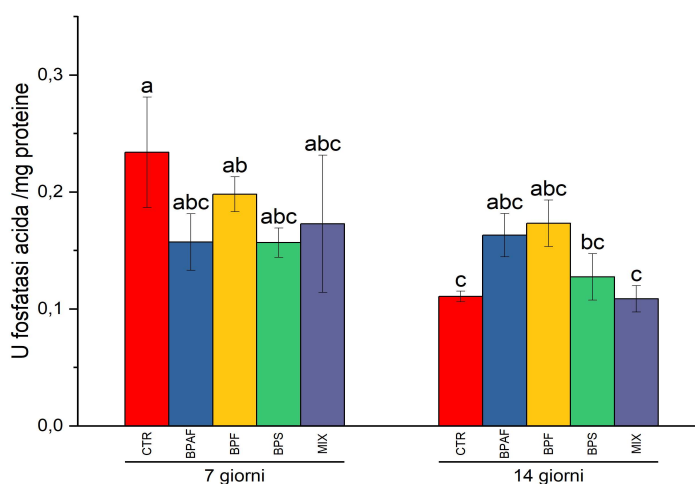


Figura 15: attività della fosfatasi acida nel lisato di emociti, espressa come U fosfatasi acida/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.7 Risultati del saggio CUPRAC nella branchia

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.01$) solo del fattore "trattamento" sul livello di antiossidanti totali presenti nella branchia (Tabella 7A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento statisticamente significativo del livello di antiossidanti totali negli animali alimentati per 7 giorni e 14 giorni con alghe esposte alla miscela di bisfenoli (MIX), rispetto ai relativi controlli (Figura 16).

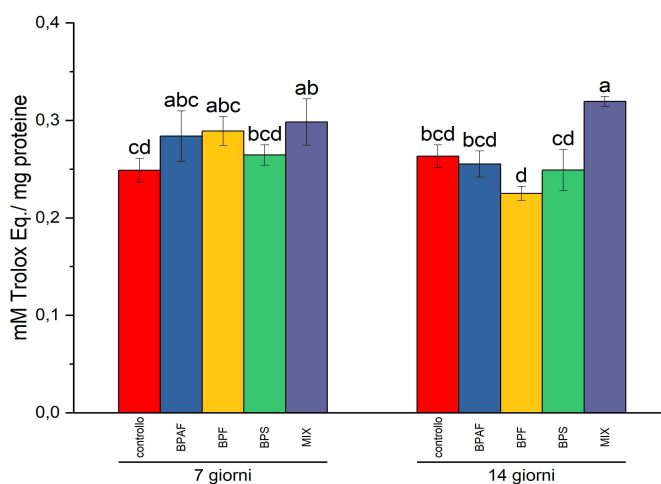


Figura 16: livello di antiossidanti totali presenti nella branchia, espresso come mM di Trolox equivalenti /mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.8 Risultati del saggio CUPRAC nella ghiandola digestiva

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.001$) solo del fattore "tempo" sul livello di antiossidanti totali presenti ghiandola digestiva (Tabella 8A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento significativo tempo-dipendente del livello di antiossidanti totali negli animali alimentati per 7 giorni con alghe esposte alla miscela di bisfenoli (MIX), rispetto al controllo (Figura 17).

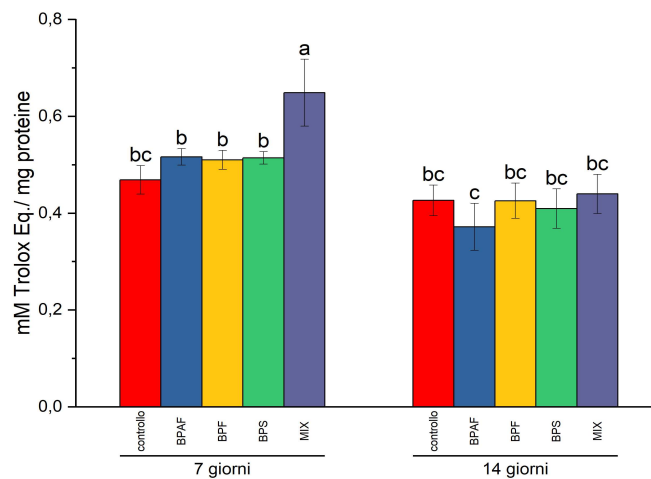


Figura 17: livello di antiossidanti totali presenti nella ghiandola digestiva, espresso come mM di Trolox equivalenti /mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.9 Attività della SOD nella branchia

L'ANOVA a due vie e il confronto a coppie hanno evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.01$) solo del fattore "tempo" sull'attività della SOD nella branchia (Tabella 9A-sezione Appendice).

Il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento significativo tempo-dipendente dell'attività della SOD negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte a BPAF e BPF, rispetto al controllo (Figura 18).

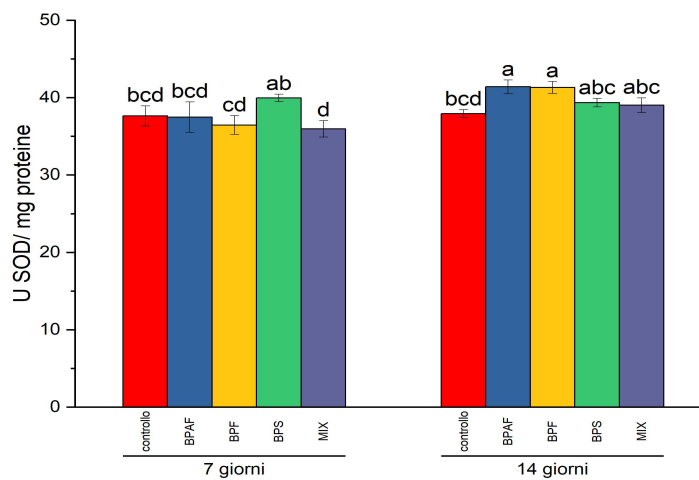


Figura 18: attività della SOD nella branchia, espressa come U SOD/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.10 Attività della SOD nella ghiandola digestiva

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.001$) dei fattori "tempo" e interazione "trattamento*tempo" ($p < 0.05$) sull'attività della SOD nella ghiandola digestiva (Tabella 10A-sezione Appendice). Tuttavia, il test post-hoc non ha evidenziato significative variazioni nei confronti a coppie (Figura 19).

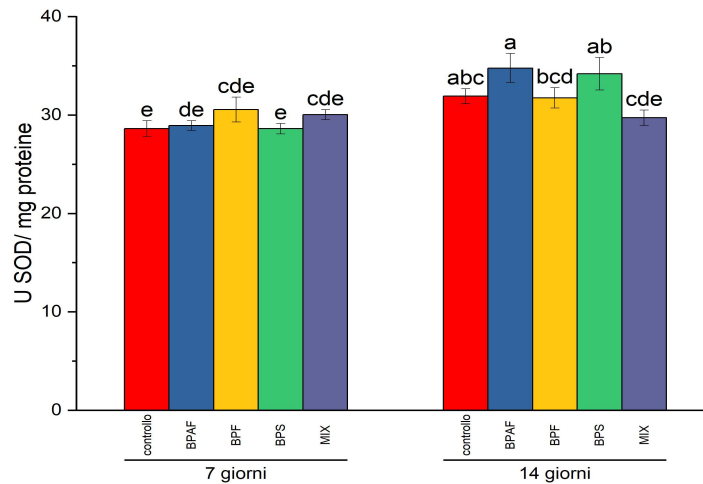


Figura 19: attività della SOD nella ghiandola digestiva, espressa come U SOD/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghes esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.11 Attività della CAT nella branchia

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.001$) dei fattori "tempo" e "trattamento" ($p < 0.05$) sull'attività della CAT nella branchia (Tabella 11A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dell'attività enzimatica della CAT negli animali alimentati per 7 giorni con alghe esposte al BPS, rispetto al controllo (Figura 20). Si nota, inoltre, un aumento statisticamente significativo dell'attività enzimatica della CAT negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte a BPF, rispetto al controllo (Figura 20).

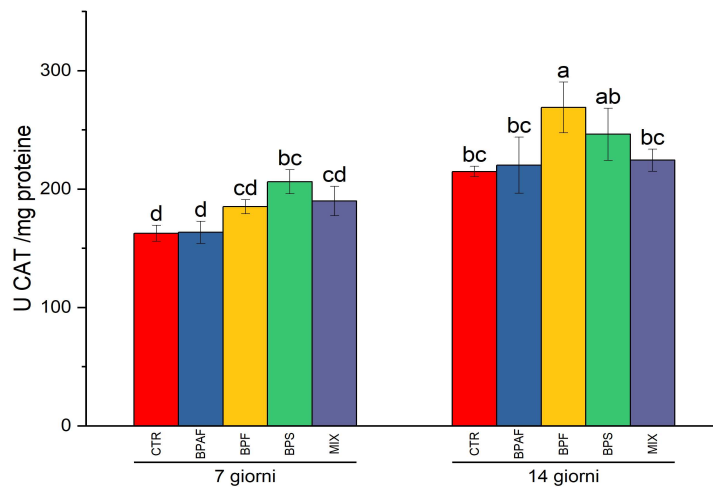


Figura 20: attività della CAT nella branchia, espressa come U CAT/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.12 Attività della CAT nella ghiandola digestiva

L'ANOVA a due vie e il confronto a coppie hanno evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.01$) solo del fattore "tempo" sull'attività della CAT nella ghiandola digestiva (Tabella 12A-sezione Appendice).

Il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento significativo tempo-dipendente dell'attività enzimatica della CAT negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte al BPF, rispetto al controllo (Figura 21).

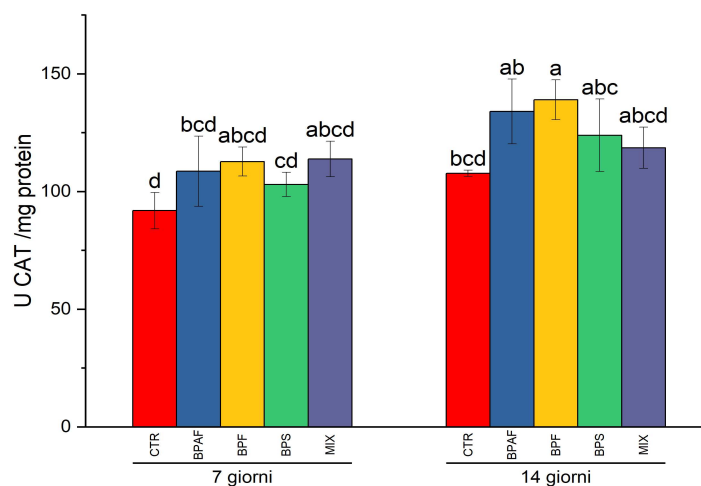


Figura 21: attività della CAT nella ghiandola digestiva, espressa come U CAT/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.13 Attività della GR nella branchia

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.001$) dei fattori "tempo", "trattamento" e interazione "trattamento*tempo" ($p < 0.01$) sull'attività della GR nella branchia (Tabella 13A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dell'attività enzimatica della GR negli animali alimentati per 7 giorni con alghe esposte alla miscela di bisfenoli (MIX), rispetto al controllo (Figura 22).

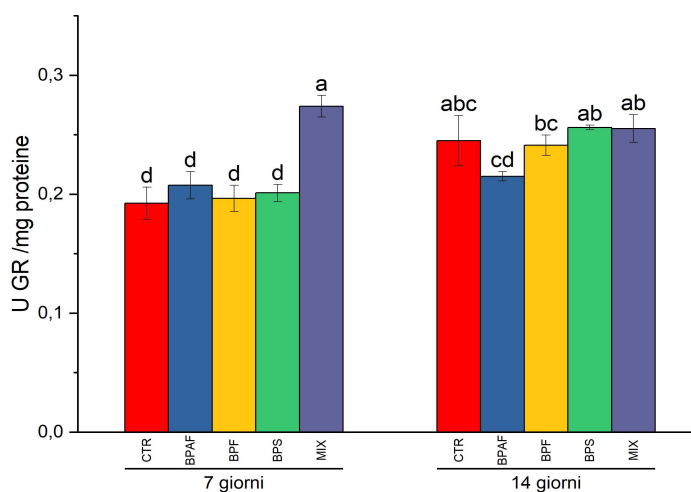


Figura 22: attività della GR nella branchia, espressa come U GR/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.14 Attività della GR nella ghiandola digestiva

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.001$) dei fattori "tempo", "trattamento" ($p < 0.01$) e interazione "trattamento*tempo" ($p < 0.01$) sull'attività della GR nella ghiandola digestiva (Tabella 14A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato una diminuzione statisticamente significativa dell'attività enzimatica della GR negli animali alimentati per 7 giorni con alghe esposte alla miscela di bisfenoli (MIX), rispetto al controllo (Figura 23).

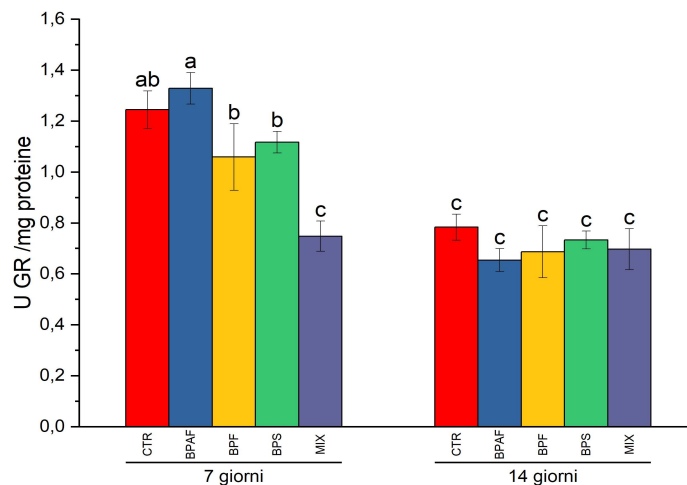


Figura 23: attività della GR nella ghiandola digestiva, espressa come U GR/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.15 Perossidazione lipidica nella branchia

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.05$) dei fattori "tempo" e interazione "trattamento*tempo" sui valori di perossidazione lipidica nella branchia (Tabella 15A-sezione Appendice).

In particolare, il test post-hoc (confronto a coppie) ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dei livelli di perossidazione lipidica negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte a BPS, rispetto al controllo (Figura 24).

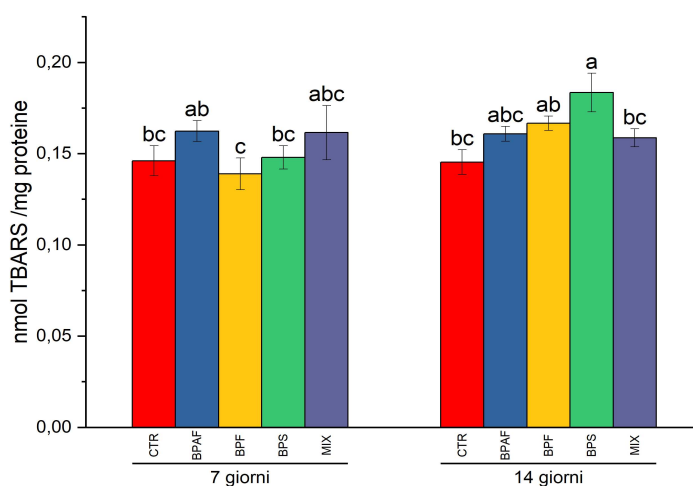


Figura 24: valori di perossidazione lipidica nella branchia, espressi come nmol TBARS/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.16 Perossidazione lipidica nella ghiandola digestiva

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.05$) dei fattori "trattamento" e interazione "trattamento*tempo" sui valori di perossidazione lipidica nella ghiandola digestiva (Tabella 16A-sezione Appendice). Il confronto a coppie ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dei valori di perossidazione lipidica negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte alla miscela di bisfenoli (MIX), rispetto al controllo (Figura 25).

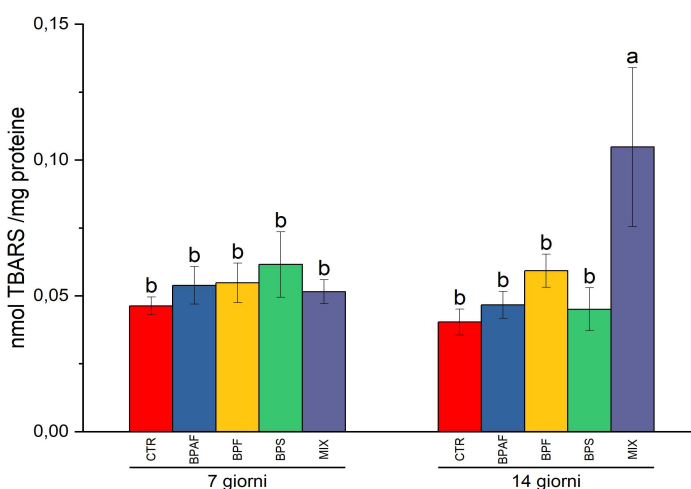


Figura 25: valori di perossidazione lipidica nella ghiandola digestiva, espressi come nmol TBARS/mg di proteine, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.17 Risultati del saggio PCC nella branchia

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.001$) solo del fattore "tempo" sui livelli di PCC della branchia (Tabella 17A-sezione Appendice; Figura 26).

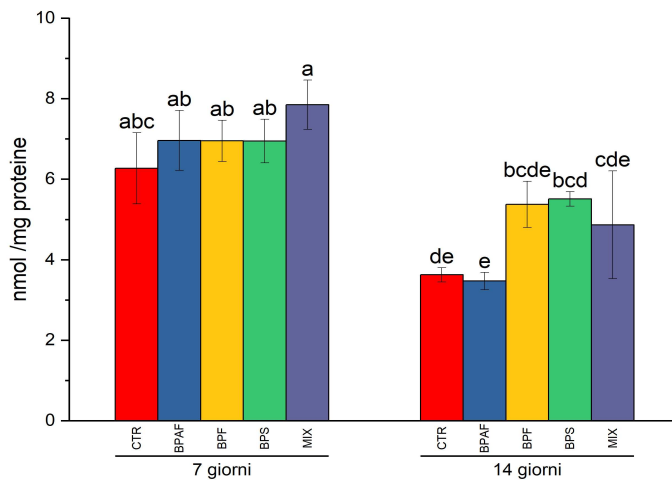


Figura 26: livelli di PCC della branchia, espressi come nmol gruppo carbonilico/mg proteina, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

4.18 Risultati del saggio PCC nella ghiandola digestiva

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto statisticamente significativo ($p < 0.01$) del solo fattore "trattamento" livelli di PCC della ghiandola digestiva (Tabella 18A-sezione Appendice).

Il confronto a coppie ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dei livelli di PCC negli animali alimentati per 14 giorni con alghe esposte al BPS, rispetto al controllo (Figura 27).

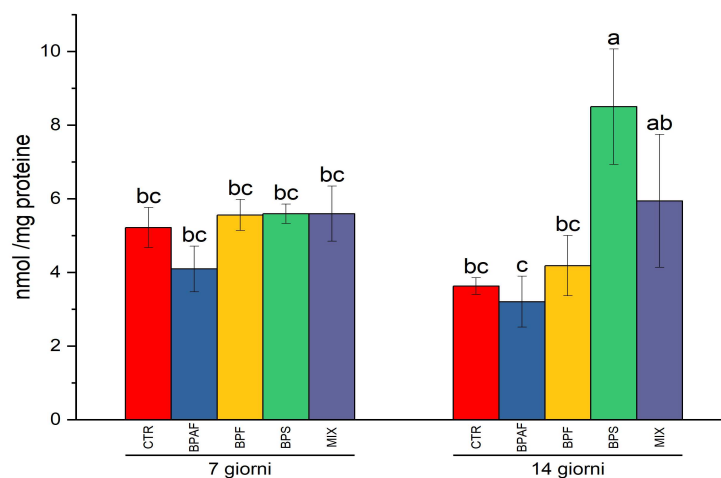


Figura 27: livelli di PCC della ghiandola digestiva, espressi come nmol gruppo carbonilico/mg proteina, in bivalvi alimentati con microalghe esposte ad analoghi del bisfenolo A.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi è parte di un progetto più ampio finalizzato alla valutazione del rischio ecotossicologico e sanitario dovuto al possibile trasferimento trofico degli analoghi del BPA in una breve catena alimentare marina costituita da specie eduli.

Lo scopo finale del presente elaborato, dunque, non è stato solo quello di valutare gli effetti di alcuni analoghi del BPA sul mollusco bivalve *Ruditapes philippinarum* alimentato con microalghe della specie *Phaeodactylum tricornutum* precedentemente esposte a BPS, BPF, BPAF e alla loro miscela (MIX), ma anche quello di stimare il possibile rischio alimentare dovuto all'ingestione dei molluschi alimentati con alghe precedentemente contaminate.

5.1 Effetti sugli emociti

Come già affermato in precedenza, gli emociti possono essere coinvolti in diverse funzioni biologiche e fisiologiche dei bivalvi, tra cui il trasporto e la digestione dei nutrienti, la formazione di tessuti e conchiglie, il mantenimento dell'omeostasi e la risposta immunitaria (Donaghy et al., 2009).

In generale, i meccanismi di difesa cellulare operata dagli emociti possono essere riassunti in tre fasi (Figura 28):

1. Chemiotassi: dopo il rilevamento di materiale estraneo nell'emolinfa o nei tessuti delle vongole, gli emociti migrano nel sito interessato. La migrazione attiva degli emociti è indotta e regolata da molecole solubili denominate fattori chemiotattici, rilasciate dall'agente estraneo o dalle cellule ospiti. La migrazione degli emociti in risposta a tali mediatori è chiamata chemiotassi (Donaghy et al., 2009).
2. Oponizzazione: gli emociti secernono diverse molecole, tra cui le più studiate sono rappresentate dalle lectine; queste sono fattori solubili o legati alla membrana emocitaria che riconoscono in maniera specifica molecole contenenti carboidrati di cellule estranee e vi si legano in

maniera reversibile. Le lectine, quindi, svolgono ruoli agglutinanti e opsonizzanti, facilitando l'interazione della superficie degli emociti con particelle estranee (Donaghy et al., 2009).

3. Fagocitosi e degradazione intracellulare del materiale estraneo: il riconoscimento e il legame del materiale non-self da parte dei recettori espressi sulla superficie degli emociti inducono il meccanismo di internalizzazione chiamato fagocitosi. Nelle vongole, la fagocitosi avviene mediante invaginazione della membrana cellulare degli emociti, seguita dalla formazione di pseudopodi e dall'internalizzazione delle particelle in un vacuolo chiamato fagosoma primario. A questo punto i granuli lisosomiali citoplasmatici migrano e si fondono con il fagosoma primario, rilasciando numerose idrolasi, tra cui fosfatasi, esterasi, amidasi ma anche enzimi ossidativi come perossidasi e citocromo c ossidasi nel cosiddetto fagosoma secondario, realizzando la degradazione enzimatica del materiale estraneo fagocitato. In questo processo possono essere prodotte anche specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) (Donaghy et al., 2009).

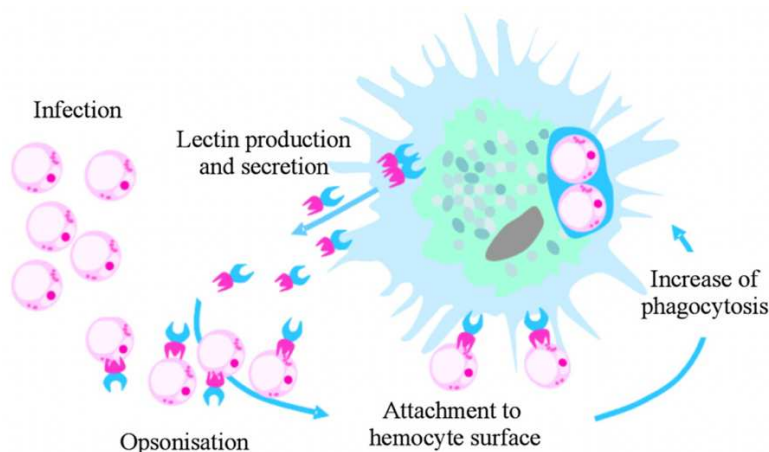


Figura 28: rappresentazione del processo di difesa cellulare operata dagli emociti (Donaghy et al., 2009).

Fattori ambientali come temperatura, salinità, nutrienti e sostanze tossiche influenzano notevolmente la salute dei bivalvi. È stato dimostrato come i parametri relativi alla difesa cellulare siano particolarmente sensibili alle variazioni

di questi fattori e riflettano lo stato fisiologico e di salute dei bivalvi stessi (Donaghy et al., 2009). Proprio per questi motivi, quindi, nel presente elaborato sono stati presi in considerazione importanti parametri degli emociti, come il THC, la proliferazione cellulare, l'attività della fosfatasi alcalina e della fosfatasi acida.

Il THC (Total Hemocyte Count) è uno degli indicatori più comunemente usati per valutare gli effetti negativi dei fattori di stress (inclusi gli inquinanti) sugli animali. Generalmente, un aumento del THC può essere dovuto ad una aumentata proliferazione cellulare o alla migrazione delle cellule dai tessuti periferici dell'organismo all'emolinfa, mentre una diminuzione del THC può essere dovuta a morte cellulare o alla migrazione degli emociti dall'emolinfa ai tessuti per contrastare una possibile infiammazione (Matozzo et al., 2012).

L'alimentazione per 7 giorni di *R. philippinarum* con microalghe della specie *P. tricornutum* precedentemente esposte a BPAF e BPF ha causato un aumento significativo del THC. Si osserva, inoltre, un importante aumento della proliferazione cellulare nei bivalvi alimentati per 7 giorni con microalghe esposte alla miscela di bisfenoli (MIX). Nei bivalvi alimentati per 14 giorni con microalghe precedentemente esposte a BPS, invece, si osserva una diminuzione significativa del THC ed un importante aumento della proliferazione cellulare.

I dati in letteratura inerenti gli effetti ottenuti con un'alimentazione "contaminata" dei bivalvi tramite l'utilizzo di alghe esposte agli analoghi del BPA e in generale studi di reti trofiche con invertebrati marini alimentati con cibo contaminato sono praticamente assenti. Ad ogni modo, sono stati condotti alcuni studi su diverse specie di invertebrati che hanno registrato valori di THC ridotti in seguito all'esposizione diretta degli animali al BPA. Nel bivalve *Tegillarca granosa*, ad esempio, il THC è diminuito in seguito a due settimane di esposizione a 10 ng/l e 100 ng/l di BPA; analogamente si sono registrate riduzioni del THC nel granchio *Charybdis japonica* esposto per 1, 3 e 6 giorni a 1 mg/l di BPA (citato in Fabrello et al., 2023b). È interessante osservare, inoltre, come nel caso dei bivalvi alimentati per 14 giorni con alghe esposte a BPS, alla diminuzione del THC corrisponda un aumento della proliferazione cellulare. Questi ridotti valori di THC, come già

spiegato precedentemente, potrebbero essere dovuti ad una mobilitazione degli emociti dall'emolinfa ai tessuti periferici; di conseguenza, un' aumentata proliferazione cellulare potrebbe essere un tentativo di compensare, almeno parzialmente, il ridotto numero di emociti circolanti, come già osservato in *Mytulus galloprovincialis* da Matozzo et al. (2018). Risultati analoghi, cioè concomitante riduzione del THC e aumentata proliferazione cellulare, sono stati presentati nello studio di Fabrello et al. (2023b), in cui esemplari di *Ruditapes philippinarum* sono stati esposti per 7 e 14 giorni a 300 ng/l di tre analoghi del BPA (BPS, BPF, BPAF e MIX). In questo studio, in particolare, si è osservata una ridotta diminuzione dei valori di THC nelle vongole esposte per 7 giorni agli analoghi del BPA e un importante aumento della proliferazione cellulare negli animali esposti per 7 e 14 giorni alla miscela di bisfenoli (MIX).

La fosfatasi alcalina e la fosfatasi acida sono enzimi idrolitici che catalizzano l'idrolisi di vari composti contenenti fosfati e agiscono come transforilasi rispettivamente a pH alcalino (8,5-9,5) e acido (4,0-5,5) (Mazorra et al., 2002). Le fosfatasi alcaline sono enzimi intrinseci della membrana plasmatica di quasi tutte le cellule animali ma si possono trovare in concentrazione minore anche nelle membrane interne al citoplasma, mentre le fosfatasi acide agiscono come enzimi marcatori per il rilevamento dei lisosomi nelle frazioni cellulari e possono essere alterate dalla presenza di xenobiotici (Mazorra et al., 2002).

L'attività della fosfatasi alcalina è stata determinata sia nell'emolinfa priva di emociti che nel lisato degli stessi. Nel primo caso i risultati non hanno evidenziato variazioni rispetto al controllo, mentre nel lisato si è riscontrata una diminuzione dell'attività enzimatica in seguito all'alimentazione per 7 giorni dei bivalvi con alghe precedentemente esposte a BPAF, BPS e alla miscela di bisfenoli (MIX), e un aumento dell'attività enzimatica in seguito all'alimentazione per 14 giorni dei bivalvi con alghe esposte a BPF. Questi risultati fanno intendere un possibile confinamento dell'enzima all'interno dell'ambiente lisosomiale degli emociti o nella membrana degli stessi, senza che esso sia stato effettivamente rilasciato durante il processo di degradazione enzimatica. L'aumentata attività della

fosfatasi alcalina nei 14 giorni di alimentazione contaminata, inoltre, può essere spiegata come un possibile inizio di attivazione della risposta immunitaria da parte degli emociti.

L'attività della fosfatasi acida, come per la fosfatasi alcalina, è stata determinata sia nell'emolinfa priva di emociti che nel lisato emocitario. In questo caso, però, nel caso del lisato non ci sono state variazioni significative dell'attività enzimatica rispetto al controllo, mentre nel caso dell'emolinfa priva di cellule si è riscontrato un aumento significativo dell'attività enzimatica della fosfatasi acida nei bivalvi alimentati per 14 giorni con microalghe precedentemente esposte a BPAF. Questi risultati fanno supporre un possibile rilascio dell'enzima dagli emociti all'emolinfa e, quindi, un'attivazione della risposta immunitaria da parte degli emociti in seguito alla loro degranulazione. Nello studio di Fabrello et al. (2023b), al contrario, emerge una significativa riduzione dell'attività della fosfatasi acida nel lisato emocitario di bivalvi esposti agli analoghi del bisfenolo A.

5.2 Stress ossidativo

È ormai risaputo che diversi additivi plastici, inclusi i bisfenoli, generano livelli elevati di RNS e ROS, come l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il radicale idrossile ($OH\cdot$), negli organismi esposti (Jenzri et al., 2023). Inoltre, numerosi enzimi, tra cui le carbossilesterasi, che convertono i composti xenobiotici in prodotti più solubili per facilitarne l'eliminazione, possono portare alla formazione di ROS (Rios-Fuster et al., 2022).

Queste molecole possono interagire con il DNA, i lipidi e le proteine danneggiandoli. Per evitare danni di questo tipo e prevenire la generazione di ROS, gli organismi esposti ai contaminanti tendono ad aumentare l'attività del loro sistema di difesa antiossidante, sia producendo un numero maggiore di enzimi antiossidanti sia aumentandone l'attività (Jenzri et al., 2023).

In questo studio è stata valutata l'attività di importanti antiossidanti nella branchia e nella ghiandola digestiva dei molluschi. Se nel caso della ghiandola digestiva i risultati non sono risultati statisticamente significativi, nel caso della branchia, invece, si osserva un aumento significativo dell'attività degli antiossidanti totali presenti nei bivalvi alimentati per 7 e 14 giorni con alghe precedentemente esposte alla miscela di bisfenoli (MIX). I risultati del recente studio di Fabrello et al. (2023b) evidenziano, invece, una significativa riduzione dell'attività degli antiossidanti totali nella branchia delle vongole esposte per 14 giorni al BPS e alla miscela di bisfenoli (MIX). Un'alterata attività del sistema antiossidante causata dalla presenza degli analoghi del BPA è stata riportata anche in altri studi condotti su diverse specie animali. Ad esempio, in un recente studio condotto sul cetriolo di mare *Holothuria poli* esposto per 12 giorni a 200 µg/l di BPS + 200 BPA µg/l si sono osservate alterazioni del sistema antiossidante a livello di tratto digestivo e respiratorio, con un generale aumento dell'attività antiossidante di enzimi quali CAT e GST negli animali (Jenzri et al., 2023). BPF, BPS e BPA sono stati testati in diverse concentrazioni (1, 5 e 10 mg/l) anche sul rotifero *Brachionus koreanus*, durante un'esposizione di 24 ore. I risultati hanno evidenziato un complessivo aumento dell'attività totale degli antiossidanti in tutte le condizioni sperimentate (citato in Fabrello et al., 2023b).

Per determinare nel dettaglio se l'alimentazione con microalghe esposte agli analoghi del BPA avesse avuto un effetto pro-ossidativo su *R. philippinarum*, in questo lavoro è stata misurata anche l'attività di enzimi antiossidanti quali SOD, CAT e GR. Nei sistemi antiossidanti, la SOD rappresenta la prima e più importante linea di difesa, poiché catalizza la dismutazione dell'anione superossido in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno. La CAT, invece, è il più importante scavenger di H₂O₂ delle cellule in quanto trasforma il perossido di idrogeno prodotto dalla SOD in acqua e ossigeno molecolare (Jenzri et al., 2023). In questo studio le attività di SOD e CAT sono state valutate sia nella ghiandola digestiva che nella branchia. Nel caso dell'attività enzimatica della SOD non è stata osservata un'alterazione statisticamente significativa rispetto al controllo, né in ghiandola

né in branchia; per quanto riguarda l'attività della CAT, invece, è stato osservato un aumento statisticamente significativo nella branchia nei bivalvi alimentati per 7 e 14 giorni con alghe precedentemente esposte a BPS e BPF rispettivamente. Nello studio di Fabrello et al. (2023b) viene messa in evidenza un'aumentata attività enzimatica sia di SOD che di CAT nella branchia di bivalvi esposti per 7 e 14 giorni alla miscela di bisfenoli (MIX); nel caso della SOD, inoltre, si è osservata un'aumentata attività enzimatica anche nel caso dell'esposizione a BPS. Un'aumentata attività della CAT si è osservata anche in uno studio condotto sul bivalve *Corbicula fluminea* in cui gli animali sono stati esposti per 96 ore a concentrazioni di BPA molto elevate, pari a 30 mg/l (Seoane et al., 2021). Una compromissione del sistema antiossidante è stata messa in evidenza anche negli epatociti della trota iridea *Oncorhynchus mykiss* esposta per 24 ore a crescenti concentrazioni di BPS (0, 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250 e 500 μ M); in particolare è stata osservata una riduzione dell'attività enzimatica della SOD, mentre l'attività enzimatica della CAT tendeva ad aumentare (citato in Fabrello et al., 2023b). Al contrario, in uno studio analogo condotto sugli epatociti della medesima specie esposti a BPF si è invece osservato un aumento dell'attività della SOD e una diminuzione dell'attività della CAT (citato in Fabrello et al., 2023b).

L'ultimo enzima antiossidante preso in considerazione in questo studio è stato la glutatione reduttasi (GR), enzima coinvolto nella conversione del glutatione da stato ossidato a stato ridotto. Anche in questo caso, come nel caso di SOD e CAT, l'attività della GR è stata valutata sia nella branchia che nella ghiandola digestiva dei bivalvi. I risultati hanno messo in evidenza un aumento dell'attività enzimatica nella branchia e una diminuzione nella ghiandola digestiva dei bivalvi alimentati per 7 giorni con microalghe precedentemente esposte alla miscela di bisfenoli (MIX). Una diminuzione dell'attività enzimatica di GR è stata evidenziata anche nella branchia di *R. philippinarum* utilizzata nello studio di Fabrello et al. (2023b), in cui i bivalvi sono stati esposti per 14 giorni a 300 ng/l di BPS. Un aumento dell'attività enzimatica di questo enzima, invece, è stato evidenziato in uno studio condotto su *C. fluminea*, in cui i bivalvi sono stati esposti a 15 e 30 mg/l di BPS per 96 ore (Seoane et al., 2021).

Sebbene i meccanismi antiossidanti delle cellule tendino di contrastare la sovrapproduzione di ROS, il danno ossidativo può essere inevitabile. In questo caso i ROS possono interagire rapidamente con gli acidi grassi polinsaturi della membrana cellulare, provocando la perossidazione lipidica (LPO) (Seoane et al., 2021), o con le proteine, portando alla formazione di gruppi carbonilici (PCC).

In questo elaborato, quindi, sono stati infine presi in considerazione i possibili danni ossidativi alle macromolecole (lipidi e proteine) di branchia e ghiandola digestiva causati dall'alimentazione "contaminata" dei bivalvi con microalghe esposte a BPS, BPAF, BPF e MIX.

Il saggio per la perossidazione lipidica ha messo in evidenza un aumento di LPO nella branchia e nella ghiandola digestiva dei bivalvi alimentati per 14 giorni con microalghe precedentemente esposte al BPS e alla miscela di bisfenoli (MIX), rispettivamente. Il saggio PCC per la stima del contenuto di gruppi carbonilici delle proteine, invece, ha evidenziato un loro aumento nella ghiandola digestiva degli animali alimentati per 14 giorni con il BPS. Nel lavoro di Fabrello et al. (2023b), invece, emerge una significativa riduzione del contenuto di gruppi carbonilici nella ghiandola digestiva dei bivalvi esposti per 7 giorni a BPAF, BPF e MIX. Per quanto concerne la perossidazione lipidica, invece, emerge un aumento nella branchia dei bivalvi esposti per 7 giorni al BPS e alla miscela di bisfenoli (MIX) e nella ghiandola digestiva dei bivalvi esposti per 14 giorni a BPF, BPS e MIX. In aggiunta, nello studio di Seoane et al. (2021), viene messo in luce un aumento della perossidazione lipidica nei bivalvi *C. fluminea* esposti a BPA (3.75; 7.5; 15; 30 mg/l) per 96 ore ma non in quelli esposti a BPS (2.5; 5; 10; 20 mg/l). Al contrario, nello studio di Jenzri et al. (2023) si osserva invece un aumento significativo della perossidazione lipidica nell'apparato respiratorio degli esemplari di *H. poli* esposti per 12 giorni a 200 µg/l di BPS.

In conclusione, i risultati del presente studio hanno messo in evidenza un generale aumento della risposta immunitaria da parte degli emociti e dello stress ossidativo da parte delle cellule della branchia e della ghiandola digestiva dei molluschi bivalvi alimentati con microalghe precedentemente esposte a BPS, BPF, BPAF e MIX. Dei parametri emocitari analizzati, THC, proliferazione cellulare, fosfatasi alcalina nel lisato di emociti e fosfatasi acida dell'emolinfa hanno evidenziato una variazione significativa in seguito all'alimentazione con microalghe esposte agli analoghi del BPA, suggerendo un'attivazione del sistema immunitario per contrastare i contaminanti forniti attraverso il cibo. Per quanto riguarda gli enzimi antiossidanti, invece, solamente l'attività della CAT nella branchia e della GR nella branchia e nella ghiandola digestiva hanno subito un'alterazione significativa. Nello specifico, l'incremento dell'attività di CAT è probabilmente dovuto all'aumento del perossido di idrogeno generatosi durante l'esposizione dei molluschi a microalghe contaminate. Allo stesso tempo, le alterazioni a carico dell'attività della GR dimostrerebbero uno sbilanciamento nel ciclo del glutatione sia nella branchia che nella ghiandola digestiva, anche se appare necessaria la valutazione di ulteriori enzimi, quali GST e GPX sia selenio dipendenti che selenio indipendenti, al fine di confermare questa ipotesi. È emerso anche un incremento significativo del livello di antiossidanti totali nella branchia, rispetto al controllo, ma non nella ghiandola digestiva. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che le branchie essendo il primo tessuto a venire in contatto con le microalghe contaminate sono i tessuti su cui principalmente si esplica l'effetto tossico dei contaminanti testati. Infine, per quanto concerne i danni ossidativi alle macromolecole è emerso un generale incremento del danno ossidativo con un aumento della perossidazione lipidica, sia in branchia che in ghiandola digestiva, e un aumento dei carbonili proteici nella ghiandola digestiva.

Questo studio, dunque, indica che BPAF, BPF, BPS e la loro miscela (MIX) sono in grado di influenzare i parametri cellulari e biochimici di *R. philippinarum* in seguito all'alimentazione di questi ultimi con microalghe contaminate. In particolare, l'alimentazione contaminata con BPS e MIX è quella che pare causare le maggiori alterazioni. Questi risultati sono in linea con quelli presentati da Fabrello et al.

(2023b), in cui gli esemplari di *R. philippinarum* sono stati direttamente esposti ai bisfenoli. Secondo tale studio, il fatto che siano BPS e MIX a causare le principali alterazioni, è spiegabile considerando la natura chimica dei composti testati: il BPS è idrofilo, mentre sia il BPAF che il BPF sono idrofobi. Ciò probabilmente consente a BPAF e BPF di legarsi alle riserve lipidiche degli animali senza entrare nel loro metabolismo. Al contrario, il BPS ha un forte impatto su diversi processi biologici, ed in particolare sul ciclo del glutatione. Si ritiene, pertanto, che anche gli effetti causati dal trattamento MIX possano essere attribuiti principalmente alla presenza del BPS, seppure siano stati evidenziati anche effetti sinergici dei tre composti se forniti in miscela (Fabrello et al., 2023; citato in Fabrello et al., 2023b). Per quanto riguarda il rischio ecotossicologico e sanitario dovuto al possibile trasferimento trofico degli analoghi del BPA lungo la catena alimentare, in questo elaborato emerge che i parametri biochimici e cellulari dei bivalvi siano stati influenzati dall'alimentazione contaminata con i bisfenoli.

Nonostante questi risultati siano già di per sé molto interessanti e smentiscano la maggiore sicurezza degli analoghi del BPA rispetto al loro stesso capostipite, emerge comunque la necessità di ulteriori studi per caratterizzare al meglio gli effetti di queste molecole lungo la catena alimentare, applicando ad esempio il design sperimentale seguito in questo studio ad una catena alimentare più complessa. Inoltre, le analisi chimiche finalizzate alla misura del bioaccumulo degli analoghi del BPA nelle microalghe, che sono in atto presso il Dipartimento di Scienze Chimiche, potranno consentire una più esaustiva comprensione dei risultati ottenuti in questo studio.

6. BIBLIOGRAFIA

Aebi, H.; 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105:121-126.

Alberghini, L., Truant, A., Santonicola, S., Colavita, G., Giaccone, V.; 2022. Microplastics in Fish and Fishery Products and Risks for Human Health: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20, 789.

Andújar, N., Gálvez-Ontiveros, Y., Zafra-Gómez, A., Rodrigo, L., Álvarez-Cubero, M. J., Aguilera, M., Monteagudo, C., Rivas, A.; 2019. Bisphenol A Analogs in Food and their Hormonal and Obesogenic Effects: A Review. *Nutrients*, 11, 2136.

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.

Baralla, E.; Pasciu, V.; Varoni, M.V.; Nieddu, M.; Demuro, R.; Demontis M.P.; 2021. Bisphenols' occurrence in bivalves as sentinel of environmental contamination. *Science of the Total Environment*, 785:147263.

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*, 72:248-54.

Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, 52:302–310.

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., Widelka, M.; 2016. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity: A Review. *Environmental Science and Technology*, 50:5438–5453.

Crapo, J.D., McCord, J.M., Fridovich, I.; 1978. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods in Enzymology*, 53:382-393.

Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K. S., Soudant, P.; 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, 297:10-24.

Fabrello, J., Matozzo, V.; 2022. Bisphenol Analogs in Aquatic Environments and Their Effects on Marine Species – A Review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10, 1271.

Fabrello, J., Ciscato, M., Moschin, E., Dalla Vecchia, F., Moro, I., Matozzo, V.; 2023. Can BPA analogs affect cellular and biochemical responses in the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin? *Journal of xenobiotics*, 13:479-491.

Fabrello, J., Ciscato, M., Munari, M., Vecchiatti, A., Roverso, M., Bogialli, S., Matozzo, V.; 2023. Ecotoxicological effects and bioaccumulation of BPA analogues and their mixture in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research*, 192, 106228.

Francius, G., Tesson, B., Dague, E., Martin-Jézéquel, V., Dufrêne Y. F.; 2008. Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environmental Microbiology*, 10(5), 1344-1356.

Frankowski, R., Zgoła-Grzeškowiak, A., Grzeškowiak, T.; 2020. Removal of Bisphenol A and Its Potential Substitutes by Biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191:1100-1110.

Frederick S.B. Kibenge; 2022. Descriptions of major farmed aquatic animal species. *Aquaculture Pathophysiology*, Volume 1, Chapter 1.

Guillard, R.R.; 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of marine invertebrate animals*, pp. 29-60.

Hahladakis, J.N., Iacovidou, E., Gerassimidou, S.; 2023. An overview of the occurrence, fate, and human risks of the bisphenol-A present in plastic materials, components, and product. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 19(1), 45-62.

Hermabessiere, L.; Dehaut, A.; Paul-Pont, I.; Lacroix, C.; Jezequel, R.; Soudant, P.; Duflos, G.; 2017. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*, 182:781-793.

<https://echa.europa.eu/hot-topics/bisphenols>, data ultima consultazione 15/06/2023.

Jenzri, M.; Gharred, C.; Bouraoui, Z.; Guerbej, H.; Jebali, J.; Gharred, T.; 2023. Assessment of single and combined effects of bisphenol-A and its analogue bisphenol-S on biochemical and histopathological responses of sea cucumber *Holothuria poli*. *Marine Environmental Research*, 188, 106032.

Kim, J. J., Kumar, S., Kumar, V., Lee Y. M., Kim, Y. S., Kumar, V.; 2019. Bisphenols as a Legacy Pollutant, and Their Effects on Organ Vulnerability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 112.

Libralato, G., Gentile, E., Volpi Ghirardini, A.; 2016. Wastewater effects on *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin): setting up a classification system. *Ecological Indicators*, 60:31-37.

Matozzo, V.; Costa Devoti, A.; Marin, M. G; 2012. Immunotoxic effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology*, 21:66-74.

Matozzo, V., Marin, M.G., Masiero, L., Tremonti, M., Biamonte, S., Viale, S., Finos, L., Lovato, G., Pastore, P., Bogialli, S.; 2018. Effects of aminomethylphosphonic acid, the main breakdown product of glyphosate, on cellular and biochemical parameters of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish and shellfish immunology*, 83:321-329.

Mazorra, M.T., Rubio, J.A., Blasco, J.; 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131:241-249.

Mecocci, P., Fano, G., Fulle, S., MacGarvey, U., Shinobu, L., Polidori, M. C., Cherubini, A., Vecchiet, J., Senin, U., Beal, M.F.; 1999. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:303–308.

Qiu, W., Zhan, H., Hu, J., Zhang, T., Xu, H., Wong, M., Xu, B., Zheng, C.; 2019. The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 192-202.

Rios-Fuster, B., Alomar, C., Capó, X., Paniagua González, G., Garcinuño Martínez, R. M., Soliz Rojas, D. L., Silva, M., Fernández Hernando, P., Solé, M., Freitas, R., & Deudero, S.; 2022. Assessment of the impact of aquaculture facilities on transplanted mussels (*Mytilus galloprovincialis*): Integrating plasticizers and physiological analyses as a biomonitoring strategy. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127264.

Ross, N. W., Firth, K. J., Wang, A., Burka, J. F., Johnson, S. C.; 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmo louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Disease of aquatic organisms*, 41:43-51.

Seoane, M., Cid, A., Esperanza, M.; 2021. Comparative acute toxicity of benzophenone derivatives and bisphenol analogues in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology*, 30:142-153.

Seoane, M., Cid, A., Esperanza, M.; 2021. Toxicity of bisphenol A on marine microalgae: single and multispecies bioassays based on equivalent initial cell biovolume. *Science of the total environment*, 767, 144363.

Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A.; 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5-5'dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, 175:408-413.

Usman, A., Ikhlas, S., Ahmad, M.; 2019. Occurrence, toxicity and endocrine disrupting potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A mini-review. *Toxicology Letters*, 222-227.

Wu, L.H., Zhang, X.M., Wang, F., Gao, C.J., Chen, D., Palumbo, J.R., Guo, Y., Zeng, E.Y.; 2018. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Science of the Total Environment*, 615:87–98.

7. APPENDICE

Nella seguente Appendice sono riportati i risultati dell'ANOVA a due vie. I valori di P statisticamente significativi sono evidenziati in rosso.

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	5,96506	5,96506	8,46013	0,0059
TRATTAMENTO	4	26,49395	6,62349	9,39397	1,89E-05
Interaction	4	17,55977	4,38994	6,22618	5,42E-04
Model	9	50,01877	5,55764	7,8823	1,41E-06
Error	40	28,20314	0,70508		
Corrected Total	49	78,22191			

Tabella 1A: risultati del test Two-way ANOVA per i risultati del saggio del THC

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	0,21783	0,21783	33,3975	9,66E-07
TRATTAMENTO	4	0,28141	0,07035	10,78663	5,02E-06
Interaction	4	0,1735	0,04337	6,65029	3,35E-04
Model	9	0,67273	0,07475	11,46057	1,27E-08
Error	40	0,26089	0,00652		
Corrected Total	49	0,93362			

Tabella 2A: risultati del test Two-way ANOVA per i risultati del saggio della proliferazione cellulare

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	0,17749	0,17749	1,0707	0,307
TRATTAMENTO	4	0,16559	0,0414	0,24973	0,90813
Interaction	4	0,71799	0,1795	1,08281	0,37794
Model	9	1,06107	0,1179	0,7112	0,69523
Error	40	6,63082	0,16577		
Corrected Total	49	7,69189			

Tabella 3A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della fosfatasi alcalina nell'emolinf

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	1,80346	1,80346	4,10327	0,04951
TRATTAMENTO	4	5,64158	1,4104	3,20896	0,02241
Interaction	4	5,23987	1,30997	2,98046	0,03032
Model	9	12,68492	1,40944	3,20677	0,00516
Error	40	17,58074	0,43952		
Corrected Total	49	30,26566			

Tabella 4A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della fosfatasi alcalina nel lisato di emociti

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	9,02E-04	9,02E-04	20,79435	4,75E-05
TRATTAMENTO	4	2,41E-04	6,03E-05	1,38874	0,25521
Interaction	4	8,52E-04	2,13E-04	4,90668	0,00258
Model	9	0,002	2,22E-04	5,10845	1,30E-04
Error	40	0,00174	4,34E-05		
Corrected Total	49	0,00373			

Tabella 5A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della fosfatasi acida nell'emolinfa

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	0,02767	0,02767	6,9953	0,01162
TRATTAMENTO	4	0,01506	0,00376	0,95164	0,44446
Interaction	4	0,02422	0,00606	1,53094	0,21166
Model	9	0,06695	0,00744	1,88062	0,08334
Error	40	0,15822	0,00396		
Corrected Total	49	0,22516			

Tabella 6A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della fosfatasi acida nel lisato di emociti

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	0,00264	0,00264	2,07587	0,15743
TRATTAMENTO	4	0,02053	0,00513	4,03005	0,00772
Interaction	4	0,01189	0,00297	2,33448	0,07203
Model	9	0,03506	0,0039	3,05933	0,00699
Error	40	0,05093	0,00127		
Corrected Total	49	0,08599			

Tabella 7A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio CUPRAC nella branchia

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	0,17139	0,17139	23,77897	<0.0001
TRATTAMENTO	4	0,06722	0,0168	2,33149	0,07232
Interaction	4	0,04008	0,01002	1,39003	0,25478
Model	9	0,27868	0,03096	4,29612	5,90947E-4
Error	40	0,2883	0,00721		
Corrected Total	49	0,56699			

Tabella 8A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio CUPRAC nella ghiandola digestiva

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	66,37701	66,37701	11,70571	0,00145
TRATTAMENTO	4	38,13735	9,53434	1,6814	0,1733
Interaction	4	55,75455	13,93864	2,4581	0,06099
Model	9	160,26891	17,80766	3,14041	0,00591
Error	40	226,81934	5,67048		
Corrected Total	49	387,08825			

Tabella 9A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della SOD nella branchia

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	121,40396	121,40396	23,86065	<0.0001
TRATTAMENTO	4	26,61021	6,65255	1,30749	0,28369
Interaction	4	72,60347	18,15087	3,56736	0,01401
Model	9	220,61764	24,51307	4,81778	2,21603E-4
Error	40	203,52164	5,08804		
Corrected Total	49	424,13929			

Tabella 10A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della SOD nella ghiandola digestiva

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	35725,24185	35725,24185	35,02257	6,16E-07
TRATTAMENTO	4	13333,8393	3333,45982	3,26789	0,02074
Interaction	4	3691,33319	922,8333	0,90468	0,47044
Model	9	52750,41434	5861,15715	5,74588	4,24E-05
Error	40	40802,53804	1020,06345		
Corrected Total	49	93552,95238			

Tabella 11A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della CAT nella branchia

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	4342,15362	4342,15362	8,85728	0,00493
TRATTAMENTO	4	3921,26693	980,31673	1,99968	0,11308
Interaction	4	771,8242	192,95605	0,3936	0,81199
Model	9	9035,24474	1003,91608	2,04782	0,05871
Error	40	19609,42987	490,23575		
Corrected Total	49	28644,67461			

Tabella 12A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della CAT nella ghiandola digestiva

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	0,00998	0,00998	15,94805	2,71167E-4
TRATTAMENTO	4	0,0179	0,00448	7,15268	1,92179E-4
Interaction	4	0,01054	0,00263	4,21123	0,00614
Model	9	0,03842	0,00427	6,82263	7,14859E-6
Error	40	0,02503	6,25698E-4		
Corrected Total	49	0,06345			

Tabella 13A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della GR nella branchia

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	1,88684	1,88684	69,30019	2,88493E-10
TRATTAMENTO	4	0,53978	0,13495	4,9563	0,00243
Interaction	4	0,50328	0,12582	4,62111	0,00367
Model	9	2,9299	0,32554	11,95665	7,14896E-9
Error	40	1,08908	0,02723		
Corrected Total	49	4,01898			

Tabella 14A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di attività della GR nella ghiandola digestiva

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	0,00169	0,00169	5,1673	0,02846
TRATTAMENTO	4	0,00252	6,29852E-4	1,93105	0,12402
Interaction	4	0,00342	8,53866E-4	2,61785	0,04921
Model	9	0,00762	8,467E-4	2,59587	0,01845
Error	40	0,01305	3,26171E-4		
Corrected Total	49	0,02067			

Tabella 15A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di perossidazione lipidica nella branchia

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	3,92537E-4	3,92537E-4	0,61484	0,43759
TRATTAMENTO	4	0,00692	0,00173	2,71054	0,04346
Interaction	4	0,00763	0,00191	2,9896	0,02996
Model	9	0,01495	0,00166	2,60171	0,01822
Error	40	0,02554	6,3844E-4		
Corrected Total	49	0,04049			

Tabella 16A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio di perossidazione lipidica nella ghiandola digestiva

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	73,69437	73,69437	32,805	1,14141E-6
TRATTAMENTO	4	16,95111	4,23778	1,88644	0,13168
Interaction	4	7,98614	1,99654	0,88876	0,4795
Model	9	98,63163	10,95907	4,87842	1,98206E-4
Error	40	89,85748	2,24644		
Corrected Total	49	188,48911			

Tabella 17A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio PCC nella branchia

Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
TEMPO	1	0,17994	0,17994	0,04276	0,83723
TRATTAMENTO	4	68,49791	17,12448	4,06937	0,00735
Interaction	4	34,3365	8,58413	2,03989	0,10712
Model	9	103,01436	11,44604	2,71998	0,01421
Error	40	168,32542	4,20814		
Corrected Total	49	271,33978			

Tabella 18A: risultati del Two-way ANOVA per i risultati del saggio PCC nella ghiandola digestiva

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone senza le quali questo lavoro di tesi non si sarebbe potuto realizzare.

Desidero in primo luogo ringraziare il mio relatore Prof. Valerio Matozzo per avermi guidata e supportata nella fase più importante dei miei studi accademici. Inoltre, ringrazio il Dott. Jacopo Fabrello per il supporto costante e le dritte indispensabili lungo tutto il percorso di internato e stesura della tesi.

Un doveroso ringraziamento va ai miei genitori. Questo traguardo lo devo a loro perché mi hanno insegnato a seguire i miei sogni, sempre e comunque. È difficile trovare una parola adatta ad esprimere la mia gratitudine per l'appoggio che mi è stato dato e per la stima che mi è stata dimostrata. Senza di voi oggi non sarei ciò che sono e tutto questo non sarebbe stato possibile. Grazie per aver creduto, assieme a me, ai miei sogni.

Un ringraziamento speciale va a Riccardo che in questi lunghi mesi mi ha sempre incoraggiata, spronata e mi ha spinto a credere in me stessa. Grazie per essere entrato a far parte della mia vita ed essere il principale motivo del mio star bene.

Grazie a mia sorella Elisa e al buon Riccardo, che hanno condiviso con me, spesso e (mal)volentieri, le ansie da pre-esame portandomi a far festa con loro perché "l'ultimo è sempre stato fatto".

Grazie a mio zio Arduino per essere stato presente in tutti questi anni e aver sempre tifato per me.

Vorrei ringraziare anche i miei amici, a partire da quelli che porto nel cuore da ormai molti anni a quelli che ho incontrato recentemente lungo il cammino. Grazie per le lunghe chiacchierate, i disagi condivisi e il prezioso supporto. Senza di voi non sarei riuscita a sopravvivere alle mie solite ansie e paranoie.

Ringrazio anche i miei fedeli e inseparabili compagni di studio, Zeus e Chloe. Vi manca solo la parola, altrimenti questa laurea è tanto vostra quanto mia.

Infine, desidero ringraziare Bar El'Jey e Buffalo's pub, non solo per avermi insegnato un lavoro così bello, ma anche per avermi dato l'opportunità di conoscere persone speciali che hanno saputo tirare fuori il meglio di me e che mi hanno permesso di maturare emotivamente.