

1222·2022  
**800**  
ANNI



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e  
Ambiente  
Dipartimento di Biologia**

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e  
il Territorio

### **Effetti del galaxolide nel bivalve**

### ***Ruditapes philippinarum***

Relatore:

**Prof. Valerio Matozzo**

Correlatore:

**Prof.ssa Sara Bogialli**

Laureando:

**Graziano Rilievo**

Matricola n. 1210558

Anno accademico 2019/2020



*A mia nonna Bertilla*

## RIASSUNTO

Nel presente lavoro di tesi si è voluto investigare gli effetti di un contaminante emergente sulle risposte biologiche dell'organismo modello *Ruditapes philippinarum*. Il composto testato è il Galaxolide® (da qui in avanti galaxolide), una fragranza muschiata ampiamente utilizzata come profumo nei prodotti per la persona e per la pulizia domestica. Il suo largo uso ne causa un continuo apporto negli impianti di trattamento delle acque reflue, dove non viene eliminato efficacemente. Si può avere così la sua presenza negli ecosistemi acquatici, dove il composto viene a contatto con gli organismi presenti, che possono accumularlo nei tessuti. Nonostante vi siano studi in letteratura sulla presenza di galaxolide negli ecosistemi e nel biota, sono carenti i dati riguardo gli effetti sui biomarker degli organismi esposti, come anche sulla sua presenza in ambiente marino. Per questo motivo, il presente lavoro è stato finalizzato a definire gli effetti a livello cellulare e biochimico in *R. philippinarum*. In particolare, si è testata la capacità del galaxolide di causare cambiamenti nei parametri emocitari e nell'attività di enzimi antiossidanti, ma anche di indurre neurotossicità e danno ossidativo alle proteine. Il disegno sperimentale ha previsto l'esposizione dei molluschi a due concentrazioni di interesse ambientale: 100 ng/L e 500 ng/L di galaxolide in acqua di mare. Le vongole sono state poi prelevate a 7, 14 e 21 gg di esposizione, per determinare le variazioni dei parametri sopra elencati.

Parallelamente alle analisi biochimiche, si è voluto verificare l'eventuale presenza del galaxolide nell'acqua di mare e nei tessuti delle vongole raccolte nella laguna di Venezia. In aggiunta, si è voluto allo stesso tempo determinare la presenza di eventuali altri contaminanti, sia nell'acqua che nei molluschi. Per fare questo, sono state condotte differenti analisi di tipo *screening untarget*, sia in GC-MS che in HPLC-HRMS.

I dati presentati nel presente lavoro di tesi possono, per quanto esposto, contribuire alla migliore comprensione dell'impatto antropico in un ecosistema peculiare come la laguna di Venezia.

## ABSTRACT

In this work, the effects of an emerging pollutant on biological responses of the clam *Ruditapes philippinarum* were investigated. The tested compound was Galaxolide®, a musk fragrance widely used in personal care and household products. Its large use leads to a continuous apport to the wastewater treatment plants, where it is not well eliminated. That could cause the presence of the contaminant in aquatic ecosystems, where it could be uptaken and bioaccumulated by the organisms. Although there are some studies on the presence of galaxolide in ecosystems and biotas, few are known about its effects on organism biomarkers, as well as its presence in the marine environment. For this reason, this work aimed to define the cellular and biochemical effects of galaxolide in *R. philippinarum*. Changes in haemocyte parameters and antioxidant enzymes activity were evaluated, as well as its neurotoxic potential and its capacity to cause oxidative damages in proteins. The concentrations tested in the exposure experiment were 100 ng/L and 500 ng/L of galaxolide in the seawater. Clam tissues for the analysis were collected at 7, 14 and 21 days of exposure.

At the same time, the presence of galaxolide in seawater and in tissues of clams collected in the Venice lagoon were evaluated. Moreover, the presence of other contaminants both in seawater and clams' tissues were also investigated. For that, contaminants screening untargeted analysis were conducted, both in GC-MS and HPLC-HRMS.

The findings of the present study can help in giving a better understanding of human impacts on the peculiar Venice Lagoon ecosystem.



## Sommario

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUZIONE</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Inquinanti emergenti in ambiente</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Personal Care Products</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>1.3 I muschi sintetici (Synthetic Musks)</b> .....  | <b>4</b>  |
| 1.3.1 Concentrazioni ambientali dei polycyclic musks .....   | 7         |
| <b>1.4 Galaxolide</b> .....  | <b>10</b> |
| 1.4.1 Proprietà chimico-fisiche .....  | 10        |
| 1.4.2 Bioaccumulo.....   | 11        |
| 1.4.3 Dati tossicologici .....   | 14        |
| <b>1.5 Sistema immunitario e inquinanti</b> .....  | <b>19</b> |
| 1.5.1 Immunotossicologia nei bivalvi.....  | 20        |
| <b>1.6 Altri biomarkers</b> .....  | <b>22</b> |
| 1.6.1 Enzimi e molecole antiossidanti.....   | 22        |
| <b>2. MATERIALI E METODI</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>2.1 Ruditapes philippinarum</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>2.2 Disegno sperimentale</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>2.3 Prelievo dei tessuti</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>2.4 Parametri emocitari</b> .....   | <b>26</b> |
| 2.4.1 THC, diametro e volume cellulare.....  | 26        |
| 2.4.2 Proliferazione cellulare (XTT) .....   | 27        |
| 2.4.3 Lattato deidrogenasi (LDH).....  | 27        |
| 2.4.4 Lisozima .....   | 28        |
| <b>2.5 Attività di enzimi antiossidanti</b> .....  | <b>28</b> |
| 2.5.1 Attività della SOD .....   | 29        |
| 2.5.2 Attività della CAT .....   | 29        |
| 2.5.3 Attività della GR.....   | 30        |
| 2.5.4 Attività della GST.....  | 31        |
| <b>2.6 PCC</b> .....   | <b>31</b> |
| <b>2.7 Attività dell'AcHe</b> .....  | <b>32</b> |
| <b>2.8 Analisi statistica</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>2.9 Analisi del galaxolide nell'acqua di mare</b> .....   | <b>33</b> |
| 2.9.1 Reagenti .....   | 33        |
| 2.9.2 Estrazione dei campioni d'acqua.....   | 34        |
| 2.9.3 GC-MS.....   | 34        |
| 2.9.4 Validazione del metodo.....  | 35        |
| <b>2.10 Analisi di screening di potenziali contaminanti nelle vongole e nell'acqua di mare</b> ..... | <b>37</b> |
| 2.10.1 Reagenti.....   | 38        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 2.10.2     | Pretrattamento ed estrazione dei campioni .....                          | 38         |
| 2.10.3     | GC-MS e HPLC-MS .....  | 39         |
| 2.10.4     | Validazione del metodo di screening in HPLC-HRMS .....                   | 40         |
| <b>3.</b>  | <b>RISULTATI.....</b>  | <b>42</b>  |
| <b>3.1</b> | <b>Parametri emocitari.....</b>  | <b>42</b>  |
| 3.1.1      | THC, diametro e volume degli emociti .....                               | 42         |
| 3.1.2      | XTT .....  | 43         |
| 3.1.3      | LDH .....  | 44         |
| 3.1.4      | Lisozima .....   | 44         |
| <b>3.2</b> | <b>Attività degli enzimi antiossidanti.....</b>                          | <b>45</b>  |
| 3.2.1      | SOD.....   | 45         |
| 3.2.2      | CAT.....   | 46         |
| 3.2.3      | GR.....  | 47         |
| 3.2.4      | GST.....   | 48         |
| <b>3.3</b> | <b>PCC .....</b>   | <b>48</b>  |
| <b>3.4</b> | <b>AChE.....</b>   | <b>49</b>  |
| <b>3.5</b> | <b>Concentrazioni di galaxolide nell'acqua di mare .....</b>             | <b>50</b>  |
| <b>3.6</b> | <b>Analisi <i>untarget</i> dei contaminanti nelle vongole .....</b>      | <b>50</b>  |
| <b>3.7</b> | <b>Analisi <i>untarget</i> dei contaminanti nell'acqua di mare .....</b> | <b>55</b>  |
| <b>4.</b>  | <b>DISCUSSIONE.....</b>  | <b>57</b>  |
| <b>4.1</b> | <b>Effetti sugli emociti.....</b>  | <b>57</b>  |
| <b>4.2</b> | <b>Stress ossidativo .....</b>   | <b>60</b>  |
| 4.2.1      | Attività degli enzimi antiossidanti .....                                | 61         |
| 4.2.2      | Carbonilazione delle proteine .....                                      | 63         |
| <b>4.3</b> | <b>Attività dell'acetilcolinesterasi .....</b>                           | <b>64</b>  |
| <b>4.3</b> | <b>Analisi chimiche.....</b>   | <b>66</b>  |
|            | <b>NOMENCLATURA .....</b>  | <b>74</b>  |
|            | <b>FORMULE.....</b>  | <b>74</b>  |
|            | <b>ACRONIMI.....</b>   | <b>74</b>  |
|            | <b>RINGRAZIAMENTI.....</b>   | <b>77</b>  |
|            | <b>BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA .....</b>                                   | <b>78</b>  |
|            | <b>APPENDICE A .....</b>   | <b>92</b>  |
|            | <b>APPENDICE B .....</b>   | <b>94</b>  |
|            | <b>APPENDICE C.....</b>  | <b>102</b> |







# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Inquinanti emergenti in ambiente

Negli ultimi decenni l'attenzione dedicata all'ambiente e alla sua tutela ha coinvolto diversi settori, quali la ricerca, gli indirizzi politico-economici e la comunicazione sociale. Tra gli studi multidisciplinari, quelli riguardanti l'analisi delle sostanze prodotte dall'uomo e degli effetti conseguenti il loro rilascio negli ecosistemi hanno certamente acquisito maggiore importanza. Lo studio degli inquinanti, intesi come agenti fisici o chimici immessi nell'ambiente in concentrazioni superiori ai livelli ambientali di fondo (*background values*) e che potrebbero causare effetti avversi sugli ecosistemi o sull'uomo, è oggi di fondamentale importanza.

Nel 1962 l'autrice Rachel Carson pubblicò il suo rinomato libro "Silent Spring", portando per la prima volta l'attenzione di opinione pubblica e comunità scientifica sull'utilizzo massiccio del famoso pesticida DDT nelle campagne americane e sui suoi effetti negativi negli ecosistemi (Carson, 2002). È questo probabilmente il primo esempio storico della elevazione di una sostanza contaminante allo status di "emergente". Vengono definiti inquinanti emergenti (*Emerging Pollutants, EPs*) quei contaminanti che ad un certo momento storico hanno acquisito maggior interesse dal punto di vista scientifico, sanitario o mediatico, poiché prima di allora non erano stati sufficientemente considerati sotto il profilo delle loro proprietà inquinanti, come conseguenza delle ridotte indagini e/o delle capacità analitiche. In particolare, Sauvé & Desrosiers definiscono un inquinante emergente quando soddisfa una delle condizioni qui elencate (Sauvé & Desrosiers, 2014):

- composti nuovi, o precedentemente sconosciuti, e segnalati di recente;
- composti noti per i quali il potenziale di contaminazione non era stato prima completamente compreso;
- composti noti per i quali le nuove informazioni sulla loro natura portano alla definizione di nuove problematiche legate alla salute dell'ambiente o dell'uomo, per esempio per fenomeni di intolleranza.

Diversi autori danno significati leggermente differenti al concetto di inquinante emergente, in ragione dei propri criteri di valutazione. Ad esempio, per la Environmental Protection Agency of United States (US-EPA), sono definiti emergenti i nuovi composti senza uno status regolatorio e il cui impatto sull'ambiente e sull'uomo è poco compreso (Deblonde et al., 2011). Comunque, la definizione di EPs rimane flessibile e di ampio genere, sottostante

a diversi criteri di natura scientifica e politica, e dipendenti dagli interessi ed obiettivi del tempo storico attraversato (Salthammer, 2020).

All'interno della categoria degli EPs ricadono numerosi composti comunemente usati nell'industria moderna e nella vita di tutti i giorni, o loro derivati: idrocarburi policiclici aromatici (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, PAHs), pesticidi, sostanze farmaceutiche, antibiotici, prodotti per l'igiene personale (*Personal Care Products*, PCPs), droghe illecite, tossine algali, nanoparticelle, microplastiche, ftalati, plasticizzanti, ritardanti di fiamma, sostanze perfluoroalchiliche, alchilfenoli, e molte altre ancora (Deblonde et al., 2011; Álvarez-Ruiz & Picó, 2020; Sauvé & Desrosiers, 2014; Montes-Grajales et al., 2017; Salthammer, 2020; Peña-Guzmán et al., 2019; Pittura et al., 2018). Molti di questi composti hanno proprietà di elevato interesse ambientale, come persistenza e refrattarietà alla degradazione (in questo senso, inquinanti organici con tali proprietà vengono definiti contaminanti organici persistenti, *Persistent Organic Pollutants*, POPs), elevata mobilità tra le diverse matrici ambientali, affinità con fasi organiche e lipidiche, possibile interferenza con processi biologici (grande rilevanza trovano gli interferenti endocrini detti *Endocrine Disruptors*, EDs), bioaccumulo e tossicità verso alcuni organismi (Álvarez-Ruiz & Picó, 2020). Un problema di questi EPs è la mancanza di una esaustiva conoscenza dei loro effetti avversi, nel medio e lungo termine, che possono manifestare sugli ecosistemi, sugli animali e sull'uomo (Deblonde et al., 2011). Questi inquinanti raggiungono e contaminano le diverse matrici ambientali attraverso l'immissione diretta da sorgenti industriali o non controllate, da reflui e fanghi, da fenomeni di run-off, da rilascio di precursori come le microplastiche (Pittura et al., 2018), ma anche da effluenti in uscita da impianti di trattamento delle acque reflue (*Wastewater Treatment Plants*, WWTPs) (Álvarez-Ruiz & Picó, 2020). In quest'ultimo caso, è largamente dimostrato che i trattamenti presenti negli impianti convenzionali spesso non sono sufficientemente efficaci per abbattere la carica di inquinanti emergenti, con conseguente loro rilascio nei corpi idrici recettori (Deblonde et al., 2011; Peña-Guzmán et al., 2019; Bester, 2004; Blair et al., 2013; Corada-Fernández et al., 2015).

Tra tutti gli EPs, i composti provenienti da sorgenti urbane che si ritrovano maggiormente in ambiente sono le sostanze farmaceutiche e i PCPs (Montes-Grajales et al., 2017; Ternes et al., 2004).

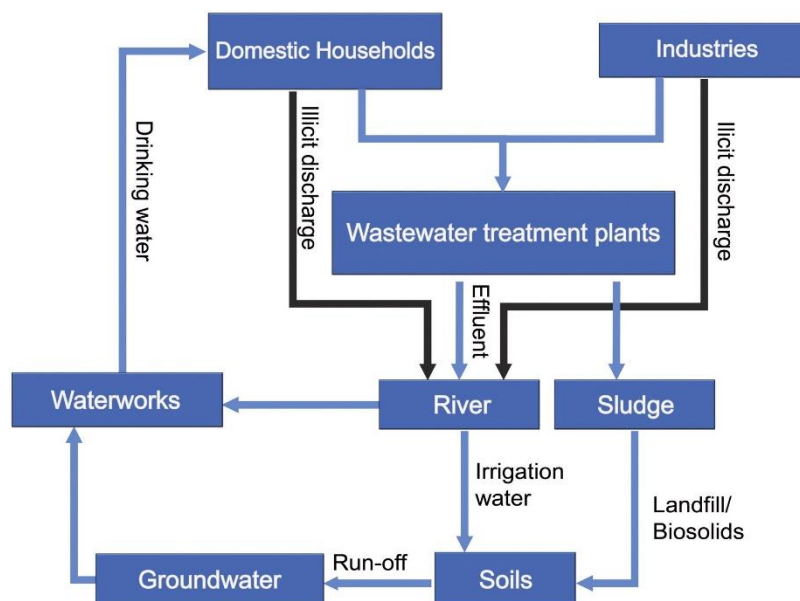
## **1.2 Personal Care Products**

I PCPs sono una classe di composti di diversa natura chimica, utilizzati in larga misura in prodotti per l'igiene personale come saponi, cosmetici, detergenti per la casa, dentifrici,

lozioni, profumi, creme solari, ecc. (Montes-Grajales et al., 2017; Brausch & Rand, 2011). Le principali classi di PCPs comprendono disinfettanti (come il triclosan), fragranze (come le sostanze muschiate), repellenti per insetti, conservanti (come i parabeni) e filtri UV (Brausch & Rand, 2011). La produzione di queste sostanze nei Paesi sviluppati è considerevole: per esempio, nei primi anni '90 in Germania la produzione annuale di prodotti per la persona superava le 550.000 tonnellate (Daughton & Ternes, 1999); in Cina, la quantità di prodotti detergenti per capelli (shampoo) venduti è cresciuta dalle 48.000 tonnellate nel 2000, alle 387.000 nel 2010 (Sun et al., 2015). I PCPs sono ampiamente utilizzati nei prodotti di ogni giorno, e il loro ampio utilizzo ne comporta di conseguenza un continuo apporto in ambiente. Il loro uso prevalentemente di tipo esterno, al contrario dei prodotti farmaceutici, non permette una loro trasformazione metabolica in eventuali prodotti più degradabili, con una conseguente immissione diretta in ambiente (Ternes et al., 2004). L'estensivo uso, lo scarico illecito, e processi di trattamento delle acque reflue urbane non del tutto efficienti per la loro rimozione, portano i PCPs ad essere agenti contaminanti rilevanti per i corpi idrici naturali (Blair et al., 2013; Roberts et al., 2016; Bu et al., 2013; Yu et al., 2013; Sun et al., 2015; Bester, 2004). Comunque, il maggior contributo all'immissione di questi composti nelle matrici acquatiche è dovuto agli effluenti in uscita dai WWTPs, molti dei quali non prevedono trattamenti in grado di abbattere efficacemente gli inquinanti di questa tipologia (Blair et al., 2013; Liu & Wong, 2013; Meador et al., 2016; Moldovan, 2006; Montes-Grajales et al., 2017; Bester, 2004). Gli effluenti degli impianti di trattamento vengono solitamente rilasciati in corpi idrici riceventi quali torrenti, fiumi, laghi e mari, determinando un trasferimento degli inquinanti a questi comparti ambientali (Montes-Grajales et al., 2017; Bester, 2004; Rainieri et al., 2017). In Figura 1.1 è riportato un diagramma riassuntivo sulla dinamica dei PCPs in ambiente.

L'interesse verso la presenza dei prodotti per la persona nelle acque è dato dai possibili effetti avversi che queste sostanze possono avere. Come altri EPs, sono state dimostrate proprietà potenzialmente dannose come bioaccumulo, persistenza, refrattarietà alla degradazione, interferenza con processi metabolici ed endocrini (Yu et al., 2013; Moldovan, 2006; Ternes et al., 2004; Brausch & Rand, 2011; Niemuth & Klaper, 2015; Rainieri et al., 2017), con conseguenze dannose specialmente per gli organismi acquatici (Brausch & Rand, 2011). Questo interesse si traduce in un sempre maggiore numero di studi su una classe così importante come può essere quella dei PCPs, in un'ottica di maggiore caratterizzazione e

comprensione di questi composti e dei loro effetti (Montes-Grajales et al., 2017; Brausch & Rand, 2011; Ternes et al., 2004).



**Figura 1.1** – Relazioni tra i diversi compartimenti nel trasporto dei PCPs. Modificato da Montes-Grajales et al. 2017.

### 1.3 I muschi sintetici (Synthetic Musks)

Tra i PCPs più utilizzati, le fragranze (*fragrances*) sono ritenute contaminanti ubiquitari nell'ambiente (Daughton & Ternes, 1999; Brausch & Rand, 2011) e risultano inoltre essere i PCPs più presenti nelle matrici ambientali acquose (Montes-Grajales et al., 2017). In questa classe contenente numerosi prodotti chimici, i più comunemente impiegati sono i muschi sintetici (*synthetic musks*) (Brausch & Rand, 2011), che rilasciano un profumo dai caratteri freschi e legnosi, molto apprezzato nell'industria dei detersivi per la casa e dei prodotti per la persona (Bozzini & Ottoboni, 2020).

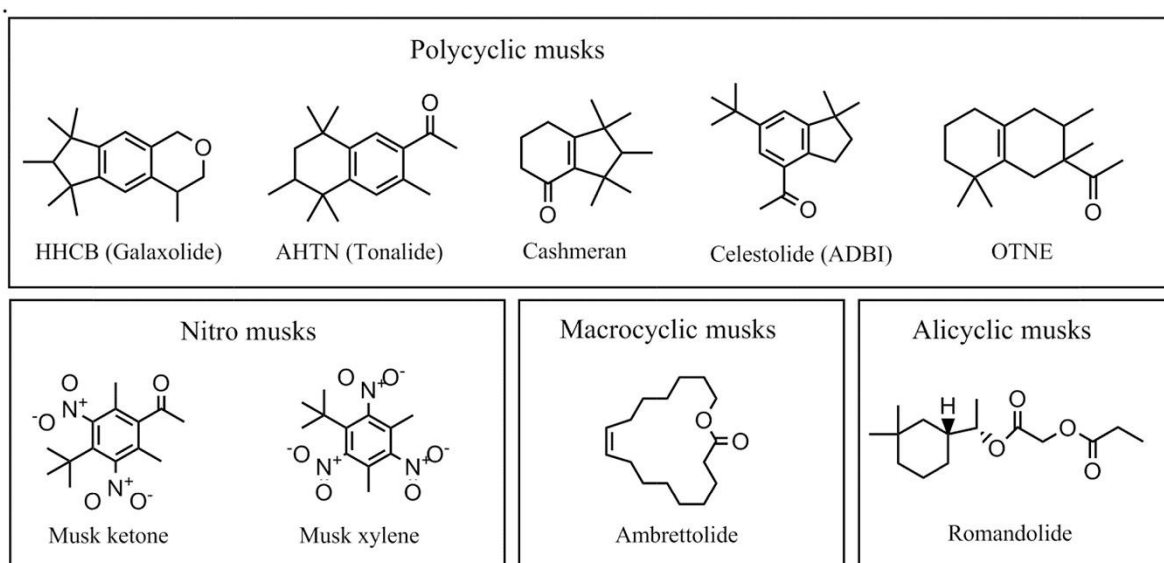
Storicamente, i muschi naturali venivano ottenuti dalle secrezioni delle ghiandole esocrine di alcuni animali, come il bue muschiato (*Ovibos moschatus*) e il cervo muschiato (*Moschus moschiferus*) (Fromme et al., 2001), da cui il nome. Ad oggi, queste fragranze sono ottenute industrialmente attraverso sintesi chimica, e vengono usate in numerosi prodotti come saponi, deodoranti, detersivi, lozioni e altro (Rainieri et al., 2017; Brausch & Rand, 2011). Il caratteristico aroma muschiato è uno dei pochi che può rimanere isolato, senza l'apporto di altre fragranze aggiuntive, come avviene invece per la maggior parte delle composizioni odorose (Frank, 2005). Inoltre, la stabilità dell'aroma l'ha reso una delle scelte più appetibili nella produzione di prodotti durevoli (Frank, 2005).

Come struttura chimica, i synthetic musks sono costituiti alla base da uno o più anelli aliciclici o benzenici (Figura 1.2), e vengono suddivisi in quattro gruppi (Kraft, 2009):

- nitro muschi (*nitro musks*, NMs): introdotte a fine '800, sono molecole composte principalmente da uno o più anelli nitrobenzenici, con addizionati gruppi alchilici, carbonilici o metossi (Vallecillos et al., 2015). Negli ultimi anni, questi composti sono stati gradualmente tolti dal mercato a causa della loro persistenza in ambiente e delle loro proprietà tossicologiche, e sono sostituiti dai composti degli altri gruppi (Daughton & Ternes, 1999). È stato ampiamente dimostrato che i NMs possono essere trasformati, nei processi WWTPs o nel metabolismo dei vertebrati, in prodotti anilini più tossici rispetto ai loro precursori (Bester, 2009). I *nitro musks* più comunemente usati in passato sono stati il *musk xylene* e il *musk ketone*, dapprima permessi solo in alcuni prodotti e in contenute quantità, e poi sottoposti a maggiore restrizione: ad esempio, nel 2011 un emendamento riguardante il regolamento REACH (Regulation, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) della Commissione Europea ha bandito definitivamente il *musk xylene* in quanto molto persistente e bioaccumulabile (European Commission, 2011). Altri composti al tempo meno utilizzati come il *musk ambrette*, il *musk moskene* e il *musk tibetene*, ad oggi sono banditi (Daughton & Ternes, 1999);
- muschi policiclici (*polycyclic musks*, PCMs): introdotti negli anni '50, sono composti formati da più anelli aromatici e aliciclici con sostituenti alchilici e carbonilici. Sono ad oggi il gruppo più utilizzato, avendo maggiori proprietà rispetto ai NMs, come resistenza alla luce e ad agenti alcalini (Vallecillos et al., 2015). Di questa categoria, il *galaxolide* (HHCB) e il *tonalide* (AHTN) rivestono certamente maggior importanza, mentre altri rappresentanti sono il *phantolide*, il *celestolide* (o *crysolide*), il *versalide* e il *traseolide* (Rainieri et al., 2017). Globalmente, la produzione di PCMs è cresciuta dalle 4300 t nel 1987, alle 5600 t nel 1997, e a 6000 t nel 2004 (di cui 1000 t di HHCB e 5000 t di AHTN) (Tumová et al., 2019). HHCB e AHTN sono i più largamente utilizzati, costituenti il 95% della quantità di PCMs in commercio (Gatermann et al., 2002). Generalmente la concentrazione di queste sostanze odorose nei prodotti per igiene e pulizia è inferiore al 2% (Martínez-Girón et al., 2010). Negli USA sono stati trovati nei profumi valori intorno i 4000 µg/g di HHCB, e in Giappone raggiungevano valori

anche di 15.000 µg/g (Rainieri et al., 2017). È stato stimato che nel 2000 le quantità utilizzate in Europa di HHCB e AHTN siano state 1473 t e 358 t per anno rispettivamente (Villa et al., 2012). Per il loro largo impiego, sia HHCB che AHTN sono inseriti nel US-EPA High Production Volume (HPV) Chemical List Database, contenente la lista dei prodotti chimici che superano la produzione di 4500 tonnellate l'anno (US-EPA, 2006). In Europa, l'uso di AHTN nell'industria è regolato dalla Direttiva Europea 2008/42/EC (European Commission, 2008);

- muschi macrociclici (*macrocyclic musks*, MCMs): sono molecole costituite da un insieme ciclico di 15 o 17 membri, con struttura molto simile alle sostanze musciate naturali (Vallecillos et al., 2015). Hanno proprietà migliori rispetto ai PCMs, come maggiore resistenza alla luce e ad agenti alcalini, profumo più intenso e maggiore biodegradabilità, ma sono comunque molto meno usati a causa dei costi di sintesi elevati (Rainieri et al., 2017; Vallecillos et al., 2015). Alcuni rappresentanti del gruppo sono il *globalide*, l'*ambrettolide*, il *muscone*, il *thibetolide* e il *velvione* (Rainieri et al., 2017);
- muschi aliciclici (*alicyclic musks*, ACMs): fragranze di recente creazione, sono conosciute come *linear musks* e il loro utilizzo è ancora poco diffuso (Vallecillos et al., 2015). In confronto ai MCMs, la loro maggiore biodegradabilità e i minori costi di produzione potrebbero portarli ad essere maggiormente considerati in futuro (Vallecillos et al., 2015). Composti rappresentativi del gruppo sono il *romandolide*, l'*helvetolide* e il *cyclomusk* (Rainieri et al., 2017).



**Figura 1.2** – Strutture rappresentative dei quattro gruppi costituenti i muschi sintetici. Modificato da Rainieri et al. (2017).



I muschi sintetici risultano di grande interesse ambientale, dato il loro ampio utilizzo e l'incompleta rimozione dalle acque trattate nei WWTPs. Per cui, come illustrato precedentemente, queste sostanze raggiungono i corpi idrici naturali, come corsi d'acqua, laghi, bacini sotterranei e mari (Bester, 2009; Rainieri et al., 2017). Le maggiori concentrazioni ambientali si ritrovano negli ambienti più vicini a zone densamente abitate o in prossimità di WWTPs (Lee et al., 2014; Sumner et al., 2010; Bester et al., 1998). I loro livelli in fiumi e torrenti dipendono anche da fattori ambientali come temperatura, quantità di luce solare e regimi di portata del corso d'acqua (Lu et al., 2015). Sebbene le concentrazioni di questi composti siano relativamente basse, il loro continuo apporto all'interno degli ecosistemi acquatici conferisce loro una caratteristica di "pseudo-persistenza" nel comparto interessato (Daughton & Ternes, 1999). Molti di questi composti sono lipofili, per cui tendono ad accumulare nei sedimenti e nelle fasi organiche così come negli organismi, particolarmente quelli acquatici (Bester, 2009). Si veda il §1.3.1 per un riassunto delle concentrazioni dei maggiori PCMs in ambiente. La finalità stessa dei prodotti cosmetici comporta un'esposizione dell'uomo a queste sostanze non trascurabile: possono potenzialmente entrare nel corpo umano attraverso penetrazione cutanea, inalazione o ingestione (Rainieri et al., 2017).

### *1.3.1 Concentrazioni ambientali dei polycyclic musks*

I PCMs sono i muschi sintetici più utilizzati ad oggi, in particolare galaxolide e tonalide (Vallecillos et al., 2015). Perciò, questi due sono generalmente predominanti in ambiente, mentre altri polycyclic musks come celestolide, phantolide e traseolide, sono stati trovati solo in alcune località (Tumová et al., 2019). L'accumulo in ambiente e nel biota è dato anche dalla loro degradazione biologica e chimica relativamente lenta, la quale dà loro una certa persistenza nei comparti ambientali (Heberer et al., 1999). In ambiente fluviale, è stato stimato il tempo di emivita dei due composti più utilizzati, galaxolide e tonalide, pari a 15 e 67 giorni rispettivamente (Bester, 2005). Sono stati eseguiti diversi studi sulla determinazione delle concentrazioni di PCMs nei diversi comparti ambientali, e di seguito se ne riporta un rapido riassunto.

Le concentrazioni più alte sono state rilevate negli scarichi in entrata degli impianti per le acque reflue, a livelli pari a 45.1 µg/L per galaxolide, 49.9 µg/L per tonalide, 44.3 µg/L per celestolide, 34.7 µg/L per phantolide e 28.4 µg/L per traseolide (Vallecillos et al., 2014). In alcuni casi sono state trovate concentrazioni anche più elevate, come nei reflui provenienti da un impianto per la produzione di cosmetici in Cina: 549.7 µg/L per galaxolide e 64.6 µg/L

per tonalide (Chen et al., 2007). Nelle acque in uscita dagli impianti WWTPs, invece, sono state trovate concentrazioni intorno a 13.3 µg/L (galaxolide), 6.8 µg/L (tonalide), 9.9 µg/L (celestolide), 3.7 µg/L (phantolide) e 4.2 µg/L (traseolide) (Tumová et al., 2019). In aggiunta, anche i fanghi provenienti dagli impianti di trattamento a fanghi attivi possono essere fonte di PCMs: sono state trovate concentrazioni pari a 703.7 mg/kg (galaxolide), 169.3 mg/kg (tonalide), 4.3 mg/kg (celestolide), 4.9 mg/kg (phantolide), and 891 µg/kg (traseolide) peso secco (*dry weight*, d.w.) (Tumová et al., 2019).

Nelle acque superficiali, vi sono evidenze di concentrazioni che raggiungono valori pari a 3.2 µg/L (galaxolide), 1.1 µg/L (tonalide), 60 ng/L (celestolide), 170 ng/L (phantolide), e 130 ng/L (traseolide) (Fromme et al., 2001). Normalmente, in corpi d'acqua superficiali con basso impatto di reflui, le concentrazioni di galaxolide e tonalide si aggirano intorno alle unità o poche decine di ng/L, mentre per gli altri PCMs si aggirano intorno alle unità di ng/L (Fromme et al., 2001). In acque in prossimità di impianti con rilascio di reflui, queste concentrazioni possono salire a centinaia o migliaia di ng/L per galaxolide e tonalide e a decine di ng/L per gli altri composti (Tumová et al., 2019). Livelli misurabili di PCMs sono stati riscontrati anche in acque di falda e acque potabili (Tumová et al., 2019). Date le loro

**Tabella 1.1**

Concentrazioni ambientali di galaxolide (HHCB) e tonalide (AHTN) misurate in acque superficiali e solidi sospesi in ambienti fluviali di diversi stati europei (D: Germania; I: Italia; NL: Paesi Bassi; RO: Romania; S: Svizzera). Tra parentesi è riportato l'anno di campionamento. Modificato da Villa et al. (2012).

| Location  | HHCB (ng/l)          |        |        | AHTN (ng/l)          |        |        | References              |
|---|----------------------|--------|--------|----------------------|--------|--------|-------------------------|
|   | Min                  | Max    | Median | Min                  | Max    | Median |                         |
| <b>Surface waters</b>                                   |                      |        |        |                      |        |        |                         |
| Molgora River, I (2010/11)                              | <0.05                | 1141   | 463    | <0.25                | 364.42 | 97     | Villa et al.            |
| Tamar estuarine, UK (2007)                              | 6                    | 28     |        | 3                    | 10     |        | Sumner et al. (2010)    |
| Somes river, RO (not indicated)                         | 172.1                | 313.7  |        | 80.9                 | 106.4  |        | Moldovan (2006)         |
| Rivers and streams, S (2001)                            | 5                    | 564    | 133    | 2.3                  | 186    | 43     | Buerge et al. (2003)    |
| Isar, Eisbach, Eebach, Ilm, Naab rivers, D (1998)       | 60                   | 330    |        |                      |        |        | Esche (2004)            |
| Elbe river, D (1997)                                    | 36                   | 152    | 118    | 24                   | 88     | 73     | Winkler et al. (1998)   |
| Ergolz, Birs, Bils, Digterbach rivers, S, (1997)        | 10                   | 260    |        | 10                   | 200    |        | Esche (2004)            |
| Mukle Saale river, D (1996–1997)                        | 150                  | 610    | 116    | 140                  | 330    | 85     | Esche (2004)            |
| 30 surface water samples from the Berlin area, D (1996) | 50                   | 12,500 | 850    | 40                   | 6800   | 500    | Heberer et al. (1999)   |
| Ruhr river, D (1995/1996)                               |                      |        | 275    |                      |        | 100    | Esche (2004)            |
| Rhine river, NL (1994–1996)                             | 10                   | 220    | 60     | 10                   | 130    | 50     | Esche (2004)            |
| Meuse river, NL, (1994–1996)                            | 10                   | 260    | 80     | 10                   | 400    | 70     | Esche (2004)            |
| Glatt river, S (1994)                                   |                      |        | 136    |                      |        | 75     | Muller et al. (1996)    |
| Ruhr river, D (1994)                                    | > 30                 | 500    |        | > 30                 | 30     |        | Esche (2004)            |
| <b>Suspended sediments</b>                              |                      |        |        |                      |        |        |                         |
|   | HHCB (ng/g d.w.)     |        |        | AHTN (ng/g d.w.)     |        |        |                         |
|   | Min                  | Max    | Median | Min                  | Max    | Median | References              |
| Molgora River, Italy (2010/11)                          | <0.7E <sup>-04</sup> | 17,993 | 1349   | <3.5E <sup>-04</sup> | 4321   | 927    | Villa et al.            |
| Tamar Estuarine, UK (2007)                              | 12                   | 29     |        | 1                    | 11     |        | Breukel and Balk (1996) |
| Surface waters NL (1997–1998)                           |                      | 1800   | 100    |                      | 1700   | 120    | Winkler et al. (1998)   |
| Elbe river, D (1997)                                    | 148                  | 736    | 442    | 194                  | 770    | 458    | Winkler et al. (1998)   |
| Elbe river, D (Hamburg–Dresden) (1997)                  | 16                   | 180    |        | 7                    | 104    |        | Breukel and Balk (1996) |
| Elbe river (1996–1997) D,                               | 150                  | 740    | 440    | 190                  | 770    | 470    | Fookan (2004)           |
| Rhine, NL (1994–1996)                                   | 50                   | 160    | 60     | 100                  | 540    | 240    | Breukel and Balk (1996) |
| Meuse river, NL (1994–1996)                             | 50                   | 580    | 200    | 60                   | 1200   | 840    | Rijs and Schäfer (1998) |

proprietà chimico-fisiche, se ne ritrovano in quantità nell'ordine di mg/kg d.w. (per galaxolide e tonalide) e di decine o centinaia di µg/kg d.w. (per gli altri composti) accumulate nei sedimenti, e di centinaia (galaxolide e tonalide) o decine (altri composti) di µg/kg d.w. nei solidi sospesi (Tumová et al., 2019). In Tabella 1.1 sono riassunti alcuni dati sulle concentrazioni misurate in corsi d'acqua europei.

Per quanto riguarda gli ambienti marini, sebbene vi siano alcuni dati riguardanti l'accumulo di PCMs nel biota (Rainieri et al., 2017), risultano limitate le informazioni sulle concentrazioni in acqua. Uno studio condotto lungo l'estuario del fiume Tamar (Cornwall, UK) e la prospiciente zona costiera, ha registrato concentrazioni da 6 a 28 ng/L di galaxolide e da 3 a 10 ng/L di tonalide, con i valori più alti nei siti di campionamento più vicini agli scarichi di impianti di trattamento delle acque (Sumner et al., 2010). Una campagna di *screening* di contaminanti organici lipofilici nella Baia Tedesca nel Mare del Nord ha riportato concentrazioni di galaxolide da 0.09 a 4.8 ng/L e di tonalide da 0.08 a 2.6 ng/L (Bester et al., 1998).

Per quanto riguarda il trasporto in atmosfera e le precipitazioni, è stata rilevata la presenza di galaxolide e tonalide in neve e ghiacciai (Villa et al., 2014).

Per la determinazione delle concentrazioni negli organismi, sono stati eseguiti diversi studi, specialmente su organismi acquatici. A titolo riassuntivo se ne riportano qui solo alcuni: per esempio, in molluschi quali mitili e vongole sono state trovate concentrazioni fino a 6.0 mg/kg (galaxolide), 1.1 mg/kg (tonalide), 11.5 mg/kg (celestolide), 285 µg/kg (phantolide) e 125 µg/kg (traseolide) relative al contenuto lipidico (*lipid weight, l.w.*) (Tumová et al., 2019). In diverse specie di pesci, le più alte concentrazioni di PCMs trovate arrivano a centinaia di mg/kg l.w. (Tumová et al., 2019). Per quanto riguarda invece le concentrazioni normalizzate sul peso fresco (*wet weight, w.w.*), i massimi valori riportati su pesci sono di 2.6 mg/kg (galaxolide) e 349 µg/kg (tonalide) w.w., mentre per i molluschi sono 27 µg/kg (galaxolide) e 5 µg/kg (tonalide) w.w. (Tumová et al., 2019). È stato evidenziato come organismi di ecosistemi che ricevono effluenti da WWTPs abbiano livelli di PCMs significativamente più alti rispetto a quelli provenienti da ambienti privi di impatti antropici (Balk & Ford, 1999b). Considerando livelli trofici più alti, non vi sono tuttora evidenze consistenti che dimostrino l'accumulo dei muschi policiclici negli organismi situati più in alto nella catena trofica: i pochi studi finora effettuati, ad esempio su mammiferi marini o squali, forniscono dati contraddittori o poco significativi (Nakata, 2005; Nakata et al., 2007; Tumová et al., 2019).

Infine, in letteratura vi sono alcune evidenze di presenza di PCMs nell'uomo. Sono stati trovati galaxolide e tonalide nel siero materno nel range di 0.17–1.4 ng/g l.w. e di <0.17–1.4 ng/g l.w., rispettivamente, ma anche nel siero del cordone ombelicale nel range di 0.67–2.7 ng/g l.w. e <0.67–2.7 ng/g l.w., rispettivamente (Kang et al., 2010), e nel latte materno nel range di 0.05–456.7 ng/g l.w. e 0.01–794.2 ng/g l.w., rispettivamente (Yin et al., 2012; Kang et al., 2010; Parolini et al., 2015).

## 1.4 Galaxolide

Il presente lavoro di tesi centra la sua attenzione sul galaxolide, molecola largamente utilizzata e presente in ambiente in modo ubiquitario per le ragioni viste in precedenza. Le principali caratteristiche chimico-fisiche sono riportate in Appendice A.

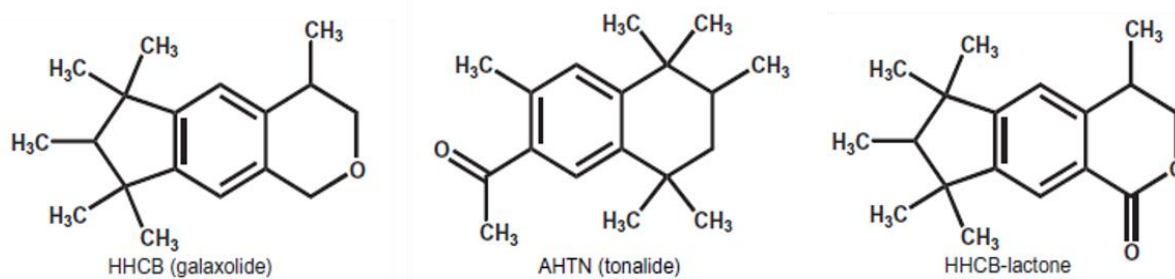
### 1.4.1 Proprietà chimico-fisiche

Il composto 1,3,4,6,7,8-esaidro-4,6,6,7,8-esametilciclopenta-[g]-2-benzopirano (sigla HHCB) è conosciuto commercialmente con il nome di galaxolide (o anche abbalide, pearlide o chromanolide). Il galaxolide possiede una bassa solubilità in acqua, pari a 1,75 mg/L (Balk & Ford, 1999b). Il coefficiente di partizione ottanolo/acqua ( $\log K_{ow}$ ) è alto, pari a 5.9 (Balk & Ford, 1999b), il che evidenzia la natura lipofila della molecola e quindi una sua probabile tendenza ad accumulare nei tessuti adiposi degli organismi (Tumová et al., 2019). Il coefficiente di partizione carbonio organico/acqua ( $\log K_{oc}$ ) è di 4.86 (Balk & Ford, 1999b), il che indica un possibile accumulo nella fase organica di suoli e sedimenti. La costante di Henry per il galaxolide ha un valore di 11.3 Pa m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> (Balk & Ford, 1999b), e indica che la volatilizzazione può essere un significativo meccanismo di trasferimento, come evidenziato in alcuni studi dove la si indicava come il maggiore meccanismo di perdita dei PCMs nelle acque naturali (Tumová et al., 2019). La pressione di vapore a 25°C corrisponde a 0.0727 Pa (Balk & Ford, 1999b).

E' da tenere presente che galaxolide e tonalide sono isomeri strutturali (Figura 1.3): entrambi hanno formula bruta C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O e peso molecolare 258.41 g/mol. Comunque, la differente struttura molecolare ne permette la determinazione selettiva con i normali metodi di separazione cromatografica (Vallecillos et al., 2015).

Riguardo ai prodotti di trasformazione, sembra che il galaxolide sia principalmente ossidato nel suo rispettivo lattone, dando il composto chiamato *galaxolidone* (o *HHCB-lactone*) visibile in Figura 1.3 (Franke et al., 1999). Questo è considerato il metabolita primario del galaxolide ed è stato ritrovato in campioni di pesce e di acqua (Bester, 2004).

Questo solleva la domanda se il galaxolidone sia originato dai processi metabolici dei pesci e della materia organica dei sedimenti fluviali, o da processi di trattamento delle acque reflue (Bester, 2004). Il galaxolidone può essere ulteriormente idrolizzato a formare il rispettivo acido (Bester, 2009). In uno studio sul metabolismo del galaxolide iniettato nella spigola (*Dicentrarchus labrax*), è stata riportata la produzione di un suo derivato idrossilato (OH-HHCB) presente nella bile (Fernandes et al., 2013). Il galaxolide è una molecola chirale (Franke et al., 1999): contiene due centri chirali i quali danno di conseguenza quattro stereoisomeri, sebbene solo i due stereoisomeri 4S siano attivi ai recettori dell'olfatto umano (Kraft & Fráter, 2001). Ognuno di questi due stereoisomeri lascia una differente impressione olfattiva (Bester, 2009).



**Figura 1.3** – Formule strutturali di galaxolide, tonalide, e del metabolita primario galaxolidone (HHCB-lactone). Modificato da Bester (2004).

#### 1.4.2 Bioaccumulo

In ecotossicologia, un parametro molto importante è il BCF (*bioconcentration factor*) (L/kg), ottenuto come  $BCF = C_B/C_W$ , dove  $C_B$  è la concentrazione di un analita target nell'organismo (mg/kg) e  $C_W$  è la concentrazione del composto precursore in acqua (mg/L) in condizioni di laboratorio (Tumová et al., 2019). Si tratta di un parametro determinato sperimentalmente e i valori sono quindi soggetti ad una certa variabilità, data anche dal diverso organismo considerato. Alcuni esempi di BCF sono quelli determinati da Balk e Ford (1584 L/kg, Tabella 1.2) e da Tumová et al. (3629 L/kg, Tabella 1.5). Altri dati si possono trovare in Tabella 1.2 e nella rispettiva letteratura (Balk & Ford, 1999b; Tumová et al., 2019; Schreurs et al., 2004; Parolini et al., 2015).

**Tabella 1.2**

Bioconcentration factors di galaxolide in diversi organismi acquatici, relativi al contenuto lipidico (BCF<sub>L</sub>) e al peso fresco (BCF<sub>w</sub>) ottenuti in condizioni di laboratorio. Modificato da Tumová et al. (2019).

| Compound   | Species   | Sample type | Exposure time [d] | BCF <sub>L</sub> [L/kg]              | BCF <sub>w</sub> [L/kg]              | n  | C <sub>w</sub> [µg/L] <sup>c</sup>     | Reference              |
|------------|---|-------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----|--|------------------------|
| Galaxolide | Bluegill sunfish ( <i>Lepomis macrochirus</i> ) | whole body  | 28                | NP                                   | 1584                                 | NP | 910 and 8 840 <sup>a</sup>             | Balk and Ford (1999a)  |
|            | Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )                | whole body  | 4                 | NP                                   | 945 <sup>b</sup><br>799 <sup>b</sup> | 6  | 20 <sup>c</sup><br>169 <sup>c</sup>    | Schreurs et al. (2004) |
|            | Zebra mussel ( <i>Dreissena polymorpha</i> )    | soft tissue | 21                | 891 <sup>b</sup><br>447 <sup>b</sup> | NP                                   | 10 | 0.10 <sup>d</sup><br>0.34 <sup>d</sup> | Parolini et al. (2015) |

**Abbreviations:** BCF = C<sub>B</sub>/C<sub>w</sub>, C<sub>B</sub> – median or mean concentration of a target compound inside biota, C<sub>w</sub> – median or mean concentration of precursor compound in exposure water, n = number of biota samples, NP – not provided, not analysed, or not specified, <sup>a</sup> – low dose and high dose concentrations, <sup>b</sup> – value was calculated from data provided in the study, <sup>c</sup> – initial concentration at time 0 h, <sup>d</sup> – arithmetic mean of initial concentrations at time 0 h

Un altro parametro utilizzato in ecotossicologia è il BAF (*bioaccumulation factor*) (L/kg), definito come  $BAF = C_B/C_w$ , dove C<sub>B</sub> è la concentrazione del composto precursore nell'organismo (mg/kg), e C<sub>w</sub> è la concentrazione del composto precursore in acqua (mg/L) (Tumová et al., 2019). Anche per questi valori si ha una certa variabilità. In Tabella 1.3 sono riportati alcuni dati di letteratura di valori di BAF del galaxolide in organismi acquatici (Fromme et al., 2001; Gatermann et al., 2002; Hu et al., 2011; Reiner & Kannan, 2011).

Le differenze dei valori di BCF e di BAF possono indicare una modalità di accumulo o di metabolismo del galaxolide specie-dipendente (Tumová et al., 2019). Teoricamente, i valori di BAF dovrebbero essere più alti, o perlomeno uguali, ai valori di BCF (Tumová et al., 2019). I valori di BAF per peso fresco qui illustrati (Tabella 1.3) variano da 18 a 952 L/kg (Fromme et al., 2001; Gatermann et al., 2002; Hu et al., 2011; Reiner & Kannan, 2011) e sono comparabili con i valori di BCF ottenuti in condizioni di laboratorio illustrati in Tabella 1.2 (Tumová et al., 2019). Questo potrebbe indicare che il galaxolide è assorbito dagli organismi a seguito dell'esposizione alla sola acqua contaminata, piuttosto che attraverso l'acqua e il cibo; oppure che il metabolismo del galaxolide può essere indotto in condizioni di esposizione a lungo termine in ambiente (Tumová et al., 2019).

**Tabella 1.3**

Bioaccumulation factors di galaxolide in diversi organismi acquatici, relativi al contenuto lipidico (BAF<sub>L</sub>) e al peso fresco (BAF<sub>w</sub>) ottenuti in campo. Modificato da Tumová et al. (2019).

| Compound  | Species   | Sample type       | BAF <sub>L</sub><br>[L/kg] | BAF <sub>w</sub><br>[L/kg] | <i>n</i>           | C <sub>w</sub><br>[µg/L] <sup>b</sup> | Reference                  |                          |
|---|---|-------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Galaxolide                                      | Eel<br>( <i>Anguilla anguilla</i> )                   | muscle            | 6357 <sup>a</sup>          | 742 <sup>a</sup>           | 54                 | 0.07                                  | Fromme et al.<br>(2001)    |                          |
|   |   |                   | 2860 <sup>a</sup>          | 509 <sup>a</sup>           | 53                 | 0.23                                  |                            |                          |
|   |   |                   | 4069 <sup>a</sup>          | 952 <sup>a</sup>           | 58                 | 1.59                                  |                            |                          |
|   |   |                   | 3504 <sup>b</sup>          | 862 <sup>b</sup>           | 165                | 0.63 <sup>a,b</sup>                   |                            |                          |
|   | Common rudd<br>( <i>Scardinius erythrophthalmus</i> ) |                   | 2600                       | 20                         | 15                 | 2.65 <sup>b</sup>                     | Gatermann et al.<br>(2002) |                          |
|   | Common tench<br>( <i>Tinca tinca</i> )                |                   | 56 300                     | 510                        | 4                  | 2.65 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
|   | Crucian carp<br>( <i>Carassius carassius</i> )        | whole body        | 24 300                     | 580                        | 7                  | 2.65 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
|   | Eel<br>( <i>Anguilla anguilla</i> )                   |                   | 1700                       | 290                        | 11                 | 2.65 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
|   | Zebra mussel<br>( <i>Dreissena polymorpha</i> )       |                   | 44 400                     | 620                        | 50                 | 2.65 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
|   | Crucian carp<br>( <i>Carassius auratus</i> )          |                   | 52 370                     | NP                         | 5                  | 0.01 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
|   | Common carp<br>( <i>Cyprinus carpio</i> )             | muscle            | 66 030                     | NP                         | 1                  | 0.01 <sup>b</sup>                     |                            | Hu et al. (2011)         |
|   | Silver carp<br>( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> ) |                   | 39 400                     | NP                         | 1                  | 0.01 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
|   | White perch<br>( <i>Morone americana</i> )            |                   | 1664 <sup>b</sup>          | 21-333 <sup>b</sup>        | 3                  | 0.01                                  |                            | Reiner and Kannan (2011) |
|   |   | 546 <sup>b</sup>  | 0.03                       |                            |                    |                                       |                            |                          |
|   |   | 5097 <sup>b</sup> | 0.004                      |                            |                    |                                       |                            |                          |
|   | Channel catfish<br>( <i>Ictalurus punctatus</i> )     |                   | 2895 <sup>b</sup>          | 18-371 <sup>c</sup>        | 3                  | 0.01 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
|   | White catfish<br>( <i>Ameiurus catus</i> )            |                   | 261                        | 18-371 <sup>c</sup>        | 1                  | 0.03 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
|   |   | 1 466             | 0.004 <sup>b</sup>         |                            |                    |                                       |                            |                          |
|   | Smallmouth bass<br>( <i>Micropterus dolomieu</i> )    | liver             | 1169 <sup>b</sup>          | 31-106                     | 2                  | 0.01 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
|   | Largemouth bass<br>( <i>Micropterus salmoides</i> )   |                   | 434                        | 30-146                     | 1                  | 0.03 <sup>b</sup>                     |                            |                          |
| Zebra mussel<br>( <i>Dreissena polymorpha</i> ) |   | 3324 <sup>b</sup> | NP                         | 4                          | 0.004 <sup>b</sup> |                                       |                            |                          |

**Abbreviations:** BAF = C<sub>B</sub>/C<sub>w</sub>, C<sub>B</sub> – median or mean concentration of a precursor compound inside biota, C<sub>w</sub> – median or mean concentration of precursor compound in exposure water, LOQ – limit of quantification, *n* = number of biota samples, NP – not provided, not analysed or not specified, <sup>a</sup> – value was calculated from data provided in the study, <sup>b</sup> – arithmetic mean

### 1.4.3 Dati tossicologici

Negli ultimi anni, sono stati realizzati vari studi tossicologici sugli effetti del galaxolide su diversi organismi, la maggior parte focalizzati sulla determinazione della tossicità acuta. Solo cinque studi riportano dati di effetti sub-cronici su sei specie acquatiche (Tabella 1.6 e Tabella 1.7), mentre per quanto riguarda gli effetti cronici sugli organismi non sembra ci siano dati disponibili (Tumová et al., 2019).

È stato dimostrato che il galaxolide può provocare sia effetti estrogenici che effetti anti-estrogenici in diversi modelli biologici e in alcuni organismi acquatici (Rainieri et al., 2017), agendo quindi da possibile interferente endocrino. Da test *in vitro*, sono emersi deboli effetti estrogenici a concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$ , ed effetti anti-estrogenici a partire da concentrazioni di 0.1  $\mu\text{M}$ , anche se i siti di legame a livello cellulare differiscono da quelli del 17 $\beta$ -estradiolo (Simmons et al., 2010; Schreurs et al., 2002). Da test *in vivo* sul pesce *Oryzias latipes*, è stato osservato un potenziale effetto estrogenico evidenziato dall'induzione della sintesi di vitellogenina nel fegato dei maschi (Yamauchi et al., 2008). Effetti anti-estrogenici sono stati riportati anche in test sia *in vitro* che *in vivo* eseguiti sul pesce *Danio rerio*, organismo modello comunemente chiamato *zebrafish* (Schreurs et al., 2004). Infine, attività anti-estrogenica, anti-androgenica e antiprogestonica è stata osservata in test *in vitro* con linee di cellule e recettori umani (van der Burg et al., 2008). Nonostante la presenza di questi studi sugli effetti del galaxolide sul sistema endocrino, la materia è tuttora oggetto di controversia, vista anche la mancanza di sufficienti dati di effetti cronici *in vivo* per confermare il potenziale effetto di interferente endocrino (Tumová et al., 2019).

In uno studio condotto sulla spigola (*Dicentrarchus labrax*) da Fernandes et al. (2013), è stato evidenziato che il galaxolide è attivamente metabolizzato dall'animale, e che agisce come debole inibitore della sintesi di androgeni ossigenati nelle gonadi dei maschi. Inoltre, sia il galaxolide che il suo metabolita idrossilato (OH-HHCB) sono stati rilevati nella bile del pesce (Fernandes et al., 2013). Lo sviluppo larvale del copepode marino *Acartia tonsa* è stato inibito dopo 5 giorni di esposizione alla concentrazione di 0.059 mg/L, corrispondente al valore di EC50 (Wollenberger et al., 2003). Anche lo sviluppo dei giovani del copepode arpacicoide *Nitocra spinipes* è stato influenzato da concentrazioni di galaxolide di 0.02 mg/L (Breitholtz et al., 2003). Il galaxolide ha influenzato altresì lo sviluppo dei giovani di altri invertebrati, come il mitilo d'acqua dolce *Lampsilis cardium* (Gooding et al., 2006), il gasteropode *Potamopyrgus antipodarum* (Pedersen et al., 2009), e l'anellide *Eisenia fetida* (Chen et al., 2011). In uno studio a lungo termine, è stato osservato che, ad una



concentrazione di esposizione di 205 µg/L, il galaxolide influisce negativamente sulla riproduzione del crostaceo *Daphnia magna* (Balk & Ford, 1999a). È stato dimostrato che gamberetti della specie *Palaemon varians* liberi di muoversi all'interno di un sistema con gradiente di concentrazioni di galaxolide, si allontanavano dai comparti con concentrazioni ambientali consistenti verso comparti con acqua marina meno contaminata (Ehiguese et al., 2019). Sulla vongola *Ruditapes philippinarum* sono stati osservati cambiamenti in parametri di stress ossidativo (come attività di enzimi quali etossiresorufin-O-deetilasi, EROD; glutatione-S-transferasi, GST; e glutatione perossidasi, GPx), di perossidazione lipidica (LPO) e di danno genotossico (rottura del DNA) a concentrazioni ambientali (Ehiguese et al., 2020). Concentrazioni rilevanti (500 ng/L) e un periodo di esposizione di 21 giorni hanno causato nel mitilo d'acqua dolce *Dreissena polymorpha* uno stress ossidativo, dato dall'alta perossidazione lipidica e dall'alto contenuto di gruppi carbonilici delle proteine, e cambiamenti nella struttura del DNA (Parolini et al., 2015). Evidenze di stress ossidativo sono state osservate anche in adulti del pesce *Carassius auratus* dopo 21 giorni di esposizione a 15 µg/L di galaxolide (Chen et al., 2012). In un mitilo marino, *Mytilus californianus*, è stata riportata un'inibizione delle difese multi-xenobiotiche (*multixenobiotic resistance*, MXR) nelle cellule delle branchie mediata dal galaxolide, il quale agisce così da chemio-sensibilizzatore (Luckenbach et al., 2004). Sono state stimate anche concentrazioni teoriche con nessun effetto (*predicted no effect concentration*, PNEC) per diverse specie terrestri (otto piante e due invertebrati), che vanno da 0.70 a 3.52 mgHHCB/kg di suolo, ottenuti da test di tossicità cronica (Wang et al., 2015).

Per quanto riguarda gli studi di tossicità su vertebrati, sono stati evidenziati danni allo sviluppo nei ratti Sprague-Dawley (malformazioni dello scheletro assiale) con dosi estremamente alte di galaxolide di 500 mg/kg al giorno (Christian et al., 1999). È da sottolineare che il dosaggio testato è di gran lunga molto più alto dell'esposizione giornaliera massima stimata sulla pelle umana, derivata dall'uso quotidiano (Christian et al., 1999). Nel 2013, un esperimento nel quale sono state somministrate singole dosi di galaxolide radio-marcato a ratti Sprague-Dawley e maiali domestici (*Sus scrofa*), ha dimostrato la totale trasformazione del composto in suoi metaboliti, i quali venivano eliminati attraverso le feci e le urine nel giro di settimane (Api et al., 2013).

In genere, l'insieme di questi studi mostra che ad oggi non è da considerare rilevante la tossicità acuta per gli organismi acquatici in natura, dato che le concentrazioni ambientali di galaxolide (vedasi §1.3.1) sono di molto inferiori alle concentrazioni testate che hanno dato

effetti dannosi acuti (Parolini et al., 2015; Gooding et al., 2006). Comunque, diversi effetti dannosi sub-letali possono verificarsi a concentrazioni che si avvicinano a quelle ritrovate in alcuni ambienti contaminati (Parolini et al., 2015; Luckenbach et al., 2004; Schreurs et al., 2004; Yamauchi et al., 2008).

In Tabella 1.6 e Tabella 1.7 sono elencati una serie di dati riguardanti test di tossicità *in vivo* su diversi organismi acquatici, raccolti da diversi lavori e riassunti nella review di Tumová et al. (2019), dalla quale sono state tratte le tabelle.

**Tabella 1.6**

Effetti *in vivo* del galaxolide su specie acquatiche. Modificato da Tumová et al. (2019).

| Trophic group                      | Species  | Age class  | Test duration (d)/method         | Solvent                          | Aeration        | Nominal conc.  | Real conc. t <sub>0</sub>                     | Real conc. t <sub>1</sub>                         | Effect  | Reference                             |  |
|------------------------------------|--|------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|--|---|---|---|---------------------------------------|--|
|                                    |  |            |                                  |                                  |                 |  | (% of nominal conc.)                          |   |   |                                       |  |
| Algae                              | <i>(Pseudokirchneriella subcapitata)</i>         | NR         | 3/static                         | DMF (0.005%) + Tween 80 (0.005%) | No              | 201 µg/L <sup>c</sup><br>466 µg/L <sup>c</sup><br>723 µg/L <sup>c</sup>                          | NM  | NM  | NE (biomass production, growth rate)<br>↓ biomass production, ↓ growth rate<br>72hEC50, ↓ biomass production                | Balk and Ford (1999b)                 |  |
| Invertebrate; annelida; clitellata | Blackworm ( <i>Lumbriculus variegatus</i> )      | NR         | 5/static                         | Isopropanol (≤0.05%)             | NR              | 394 µg/L   | NM  | NM  | ↓ mobility (120hEC50)   | Artola-Garicano et al. (2003b)        |  |
| Invertebrate; crustacean           | <i>(Artemia salina)</i>                          | NR         | 2/NR                             | DMSO (5%)                        | No <sup>d</sup> | 1.88 mg/L  | NM  | NM  | 48hLC50   | Doležalová Weissmannová et al. (2013) |  |
|                                    | Marine calanoid copepod ( <i>Acartia tonsa</i> ) | Egg-larvae | 5/NR                             | Acetone (<0.01%)                 | No <sup>d</sup> | 72 µg/L<br>26 µg/L   | NM  | NM  | ↓ develop-mental rate (120hEC10)<br>↓ develop-mental rate (120hEC50)  | Wollenberger et al. (2003)            |  |
|                                    |  | Adult      | 2/static                         | Acetone (<0.01%)                 | No <sup>d</sup> | 300 µg/L<br>120 µg/L<br>470 µg/L   | NM  | NM  | NE (mortality)<br>48hLC10<br>48hLC50  |                                       |  |
|                                    | <i>(Daphnia magna)</i>                           | NR         | 2/NR                             | DMSO (5%)                        | No <sup>d</sup> | 1.11 mg/L  | NM  | NM  | 48hEC50   | Doležalová Weissmannová et al. (2013) |  |
| Invertebrate; crustacean           | <i>(Daphnia magna)</i>                           | Adult      | 21/semi-static                   | DMF (0.005%) + Tween 80 (0.002%) | NR              | 111 µg/L <sup>c</sup><br>205 µg/L <sup>c</sup><br>282 µg/L <sup>c</sup><br>293 µg/L <sup>c</sup> | NM  | NM  | NE (mobility, reproduction)<br>↓ reproduction of survival adults (LOEC)<br>↓ reproduction (21dEC50)<br>↓ mobility (21dLC50) | Balk and Ford (1999b)                 |  |
|                                    | Harpacticoid copepod ( <i>Nitocra spinipes</i> ) | Larvae     | 22/semi-static                   | Acetone (0.01%)                  | No <sup>d</sup> | 7 µg/L <sup>a</sup><br>20 µg/L <sup>a</sup>  | 117%  | 19% <sup>a</sup> (8 d)<br>19% <sup>a</sup> (18 d) | NE (develop-mental rate)<br>↓ develop-mental rate   | Breitholtz et al. (2003)              |  |
|                                    | <i>(Thamnocephalus platyurus)</i>                | NR         | 1/NR                             | DMSO (5%)                        | No <sup>d</sup> | 1.23 mg/L  | NM  | NM  | 24hLC50   | Doležalová Weissmannová et al. (2013) |  |
| Invertebrate; rotifera             | <i>(Brachionus calyciflorus)</i>                 | NR         | 1/NR                             | DMSO (5%)                        | No <sup>d</sup> | 1.99 mg/L  | NM  | NM  | 24hLC50   | Doležalová Weissmannová et al. (2013) |  |
| Invertebrate; insect               | Harlequin fly ( <i>Chironomus riparius</i> )     | Larvae     | 4/static                         | Isopropanol (≤0.05%)             | NR              | 288 µg/L   | NM  | NM  | 96hLC50   | Artola-Garicano et al. (2003b)        |  |
| Invertebrate; mollusca; bivalve    | Zebra mussel ( <i>Dreissena polymorpha</i> )     | Adult      | 18/semi-static<br>21/semi-static | Acetone (0.01%)                  | No              | 100 ng/L   | 97% (mean of 8 samples taken during the exp.) | NR  | ↑ DNA strand breaks<br>NE (DNA strand breaks, oxidative stress)   | Parolini et al. (2015)                |  |
| Invertebrate; mollusca; bivalve    | Zebra mussel ( <i>Dreissena polymorpha</i> )     | Adult      | 21/semi-static                   | Acetone (0.01%)                  | No              | 500 ng/L   | 67% (mean of 8 samples taken during the exp.) | NR  | ↑ DNA strand breaks, oxidative stress (↑ lipid peroxide, ↑ protein carbonyl)  | Parolini et al. (2015)                |  |
|                                    | Freshwater mussel ( <i>Lampsilis cardium</i> )   | Larvae     | 2/static                         | Acetone (0.005%)                 | No              | 800 µg/L   | 88%   | 53% <sup>c</sup> (1 d)<br>47% <sup>c</sup> (2 d)  | NE (mortality)  | Gooding et al. (2006)                 |  |
|                                    |  |            |                                  |                                  |                 |  | 1000-->1750                                   | NR  | NR  | 24hLC50; 48hLC50                      |  |

Continua nella pagina successiva

**Tabella 1.7**

(continua) Effetti *in vivo* del galaxolide su specie acquatiche. Modificato da Tumová et al. (2019).

| Trophic group    | Species   | Age class       | Test duration (d)/method | Solvent                           | Aeration         | Nominal conc.                      | Real conc. t <sub>0</sub> | Real conc. t <sub>1</sub>                        | Effect  | Reference                    |
|------------------|---|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------------------------|---------------------------|--|---|------------------------------|
|                  |   |                 |                          |                                   |                  |                                    | (% of nominal conc.)      |  |   |                              |
|                  |   |                 |                          |                                   |                  | µg/L<br>999->1750                  |                           |  |   |                              |
|                  |   | Juvenile        | 4/semi-static            | Acetone (0.005%)                  | No               | 100 µg/L                           | 62%                       | 43% <sup>c</sup> (4 d)                           | NE (growth)   |                              |
|                  |   |                 |                          |                                   |                  | 200 µg/L                           | 68%                       | 47% <sup>c</sup> (4 d)                           | ↓ growth  |                              |
|                  |   |                 |                          |                                   |                  | 153–831 µg/L                       | NR                        | NR   | 96hEC50   |                              |
| Vertebrate; fish | Bluegill sunfish ( <i>Lepomis macrochirus</i> ) | NR<br>m = 1.5 g | 21/flow-through          | DMF (0.005%) + Tween 80 (0.005%)  | NR               | 93 µg/L <sup>c</sup>               | NM                        | NM   | NE (growth, mortality)<br>Changes in behaviour (irregular respiration, bottom and tail dominate swimming, loss of equilibrium, righting reflex appearing) | Balk and Ford (1999b)        |
|                  |   |                 |                          |                                   |                  | 182 µg/L <sup>c</sup>              |                           |  |   |                              |
| Vertebrate; fish | Bluegill sunfish ( <i>Lepomis macrochirus</i> ) | NR<br>m = 1.5 g | 21/flow-through          | DMF (0.005%) + Tween 80 (0.005%)  | NR               | 452 µg/L <sup>c</sup>              | NM                        | NM   | 21dLC50   | Balk and Ford (1999b)        |
|                  | Gold fish ( <i>Carrasius auratus</i> )          | Adult           | 14/semi-static           | Acetone + Tween 80 (emulsifier)   | NR               | 15 µg/L                            | NM                        | NM   | ↑ CAT, ↑ POD, ↑ MDA, ↑ SOD activity in the liver  | Chen et al. (2012)           |
|                  |   |                 | 21/semi-static           |                                   |                  |                                    |                           |  | ↑ CAT activity in the liver   |                              |
|                  | Fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> )   | Embryo-larvae   | 36/flow-through          | Triethylene glycol                | NR               | 140 µg/L <sup>c</sup>              | NM                        | NM   | ↓ growth, ↓ survival, ↓ development   | Balk and Ford (1999b)        |
|                  | Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )               | Larvae          | 4/semi-static            | DMSO (0.1%)                       | Yes <sup>d</sup> | 950 µg/L                           | NR                        | NR   | 96hLC50   | Yamauchi et al. (2008)       |
|                  |   | Adult male      | 3/semi-static            | DMSO (0.01%)                      | Yes <sup>d</sup> | 5 µg/L                             | 96%                       | <0.4% (1 d)                                      | NE (VTG, mRNA expression)   |                              |
|                  |   |                 |                          |                                   |                  | 50 µg/L                            | 98%                       | 0.3% (1 d)                                       | ↑ mRNA expression of <i>vtg II</i> in the liver   |                              |
|                  |   |                 |                          |                                   |                  | 500 µg/L                           | 87%                       | 0.1% (1 d)                                       | ↑ VTG; ↑ mRNA expression of <i>era</i> , <i>vtg I</i> , <i>II</i> in the liver  |                              |
|                  | Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )                | Embryo          | 4/NR<br>7/NR             | Acetone<br>Acetone (0.005%) + DEP | NR<br>NR         | 4.45 mg/L<br>140 µg/L <sup>b</sup> | NM<br>NM                  | NM<br>30% (12 h)                                 | 96hLC50<br>↑ SOD, ↓ MDA activity, ↓ SP  | Zhang et al. (2012)          |
|                  |   | Adult           | 2/NR                     | NR                                | No <sup>d</sup>  | 1 mg/L                             | NM                        | NM   | NE (development)  | Carlsson and Norrgren (2004) |
| Vertebrate; fish | Transgenic zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )     | Juvenile        | 4/NR                     | DMSO (0.01%)                      | No <sup>d</sup>  | 25.8 µg/L <sup>b</sup>             | 78% <sup>b</sup>          | 14% <sup>b</sup> (1 d)<br>15% <sup>b</sup> (4 d) | ER mediated anti-estrogenic effect  | Schreurs et al. (2004)       |

AD – androstenedione, βAD – 11β-hydroxyandrostenedione, CAT – catalase (oxidative stress), conc. – concentration, DEP – diethylphthalate, DMF – dimethyl formamide, DMSO – dimethyl sulfoxide, EC – effective concentration, IC – inhibitory concentration, *era* – estrogen receptor type α, LC – lethal concentration, LOEC – lowest-observed effect concentration, MDA – malondialdehyde, NE – no effect, NM – data not measured, NR – data not reported, POD – peroxidase, SOD – superoxide dismutase, SP – soluble protein, t<sub>0</sub> – real initial concentration (concentration level at the beginning of the experiment), t<sub>1</sub> – real concentration level at the defined time endpoint during the experiment, *vtg I, II* – vitellogenin type I and II.

<sup>a</sup> Bath was not renewed during the whole experiment.

<sup>b</sup> Nominal concentrations were calculated by dividing the nominal weights of tested chemicals by water volume.

<sup>c</sup> Mean measured concentration = calculated as mean concentration at the beginning and end of the test.

<sup>d</sup> Personal communication.

## 1.5 Sistema immunitario e inquinanti

L'immunotossicologia è lo studio degli effetti delle sostanze xenobiotiche sul sistema immunitario di un organismo. Data le sue origini ai primi anni '70, a seguito del riconoscimento dell'alterazione delle funzioni dell'apparato immunitario all'esposizione di agenti chimici, droghe o inquinanti, e al conseguente aumento della sensibilità alle infezioni di un organismo (Germolec et al., 2017). Molti studi dimostrano la riduzione della resistenza alle infezioni a causa delle malattie immunodepressive, come possibile conseguenza dell'esposizione a sostanze xenobiotiche (Germolec et al., 2017). Con il passare degli anni, la ricerca in questo campo ha portato alla comprensione che allergie, immunodepressioni, e in certi casi anche l'autoimmunità, possono essere risposte immunitarie agli agenti immunotossici, piuttosto che risultati indipendenti dell'esposizione chimica (Germolec et al., 2017).

Il sistema immunitario è un sistema di difesa complesso, una rete distribuita in tutti i tessuti dell'organismo, con cellule specializzate per garantire la difesa contro i patogeni (Costa et al., 2020). Il ruolo centrale del sistema immunitario è riconoscere gli elementi che non appartengono all'organismo (*non-self*) da quelli che invece lo sono (*self*) (Peakall et al., 1992). Quando un elemento non-self come cellule estranee, microorganismi esogeni (batteri, virus, funghi, parassiti, ecc.) o sostanze xenobiotiche (prodotti chimici, pesticidi, ecc.) entra nell'organismo, scatena la risposta immunitaria, la quale può essere sia umorale che cellulare (Peakall et al., 1992). Le cellule del sistema immunitario (come i linfociti) sono in grado di rilasciare diversi mediatori dell'infiammazione, i quali sono in grado di attivare processi proinfiammatori e antinfiammatori, e regolare i percorsi intracellulari (Costa et al., 2020). Alcuni di questi mediatori infiammatori sono le citochine, specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) e specie reattive dell'azoto (*reactive nitrogen species*, RNS, come il monossido di azoto) (Costa et al., 2020). In aggiunta ai componenti cellulari, il sistema immunitario umorale fornisce diversi tipi di proteine che eseguono un'importante funzione immunitaria: le immunoglobuline (anticorpi) e gli elementi del sistema del complemento (proteine che mediano una serie di interazioni che portano alla lisi delle cellule esogene) (Peakall et al., 1992).

L'immunotossicità è definita come effetto avverso sul sistema immunitario dato da una sostanza esterna (Peakall et al., 1992). Una sostanza chimica è classificata come immunotossica quando induce, come tale o come prodotto del metabolismo, effetti indesiderati sull'organismo, inclusi (Peakall et al., 1992):

- azioni dirette e/o indirette sul sistema immunitario;
- una risposta a base immunitaria al composto o ai suoi metaboliti;
- una modifica delle strutture dell'ospite data da elementi che non sono riconoscibili come *self*.

Questi effetti avversi possono essere classificati funzionalmente, come immunosoppressione chimica, allergia, immuno-potenziamento, autoimmunità o resistenza alterata dell'ospite alle infezioni (Peakall et al., 1992). A causa della complessità del sistema immunitario, sfortunatamente non c'è un singolo test sulla funzione immunitaria che possa dare una adeguata valutazione degli effetti avversi di una sostanza xenobiotica sul sistema (Peakall et al., 1992).

Per una esaustiva conoscenza degli effetti immunotossici delle sostanze, negli anni sono stati sviluppati e perfezionati numerosi test immunotossicologici (Germolec et al., 2017). Tradizionalmente, i test su animali *in vivo* e i modelli *in vitro* sono quelli più utilizzati in laboratorio, poiché per chiare ragioni etiche non è possibile eseguire test sull'uomo (Costa et al., 2020). Per cui l'utilizzo di animali o cellule, oltre che per gli studi ecotossicologici ambientali in sé, è finalizzato agli studi immunotossicologici per l'essere umano, per comprendere quei meccanismi molecolari che possono essere riproducibili su di esso (Costa et al., 2020). Più recentemente, l'utilizzo di nuovi metodi di valutazione della tossicità, come i metodi *in silico* o i modelli computazionali (ad esempio QSPR/QSAR) stanno guadagnando sempre più interesse (Costa et al., 2020), anche in funzione di limitazione degli esperimenti *in vivo*.

### 1.5.1 Immunotossicologia nei bivalvi

Molti dati ecotossicologici vengono ottenuti utilizzando i bivalvi come organismi modello, studiando la risposta del sistema immunitario degli animali alla presenza di prodotti chimici o tossine (Matozzo & Gagné, 2016; Galloway & Depledge, 2001). I molluschi in generale hanno un sistema immunitario innato, con sia componenti cellulari che umorali, che assicura un'efficace immunità non-specifica (Matozzo & Gagné, 2016). Le loro cellule deputate alla funzione immunitaria, gli emociti, possono esercitare diverse attività quali riconoscimento di particelle *non-self*, chemiotassi, fagocitosi, incapsulamento, digestione intracellulare, degranolazione con rilascio di sostanze citotossiche come ROS e RNS, e rilascio di peptidi antimicrobici (Matozzo & Gagné, 2016). I bivalvi sono molluschi sedentari e filtratori, per cui accumulano grandi quantità di particelle sospese durante l'alimentazione. Di conseguenza, possono accumulare nel tempo significative concentrazioni di xenobiotici, anche superando

di molto le concentrazioni osservabili nella colonna d'acqua o nei sedimenti (Ademollo et al., 2017). I bivalvi sono facilmente utilizzabili sia per test *in vitro* che *in vivo*: l'emolinfa può essere estratta efficacemente dall'animale senza comportarne la sua uccisione (Matozzo & Gagné, 2016).

Per gli studi ecotossicologici è di rilevante importanza la valutazione di alcuni parametri immunologici, chiamati *immunomarkers*, per valutare gli effetti sul sistema immunitario da parte di sostanze xenobiotiche. Tra gli *immunomarkers* più utilizzati si annoverano (Matozzo & Gagné, 2016):

- *THC (total hemocyte count)*: ovvero il numero di cellule su mL di emolinfa;
- *Hemocyte viability*: la vitalità delle cellule, misurata in *flow cytometry* tramite fluorescenza, oppure con saggi di proliferazione cellulare come il saggio colorimetrico con sale di tetrazolio (XTT);
- *Hemocyte diameter*: diametro degli emociti;
- *Hemocyte volume*: volume degli emociti;
- *Hemocyte adhesion capability*: la capacità di adesione degli emociti alle superfici o di formare aggregati;
- *Phagocytic activity*: l'attività di fagocitosi delle cellule, determinata tramite *flow cytometry* o con saggi citochimici in presenza di particelle target (lievito);
- *Enzymes activities*: attività di differenti enzimi idrolitici e/o ossidativi;
- *Lysosomal membrane stability*: alterazione della stabilità della membrana lisosomiale;
- *ROS production*: la produzione delle specie reattive dell'ossigeno mediatrici dell'infiammazione;
- *RNS production*: la produzione delle specie reattive dell'azoto mediatrici dell'infiammazione.

L'esposizione a certi inquinanti, come anche significative variazioni ambientali, possono portare ad un'alterazione delle difese immunitarie, evidenziabile tramite i parametri sopra descritti (Galloway & Depledge, 2001). Alcune delle sostanze contaminanti in grado di causare variazioni nel sistema immunitario sono metalli pesanti, PCBs (*polychlorinated biphenyl substances*), solventi, PAHs, pesticidi, ammine aromatiche, e molte altre (Galloway & Depledge, 2001). Queste variazioni del sistema immunitario possono essere di diverso tipo e i meccanismi immunotossici alla loro base sono spesso complessi. Ad esempio, uno

xenobiotico può interferire con i recettori cellulari degli emociti ed innescare risposte eccessive (Galloway & Depledge, 2001), oppure alterare la produzione di ATP nel metabolismo energetico cellulare, riducendo la funzionalità degli emociti stessi (Galloway & Depledge, 2001) rendendo così l'organismo più suscettibile ai patogeni (Matozzo et al., 2012a); ancora, l'azione dei lisosomi e degli enzimi litici per la degradazione degli xenobiotici produce specie reattive quali ROS e RNS con funzione battericida (Galloway & Depledge, 2001), ma possono altresì avere un'azione ossidante su altre strutture cellulari (Livingstone, 2001). La valutazione di questi ed altri parametri emocitari può quindi dare informazioni su una possibile compromissione del sistema immunitario causata da una sostanza xenobiotica (Galloway & Depledge, 2001).

## **1.6 Altri biomarkers**

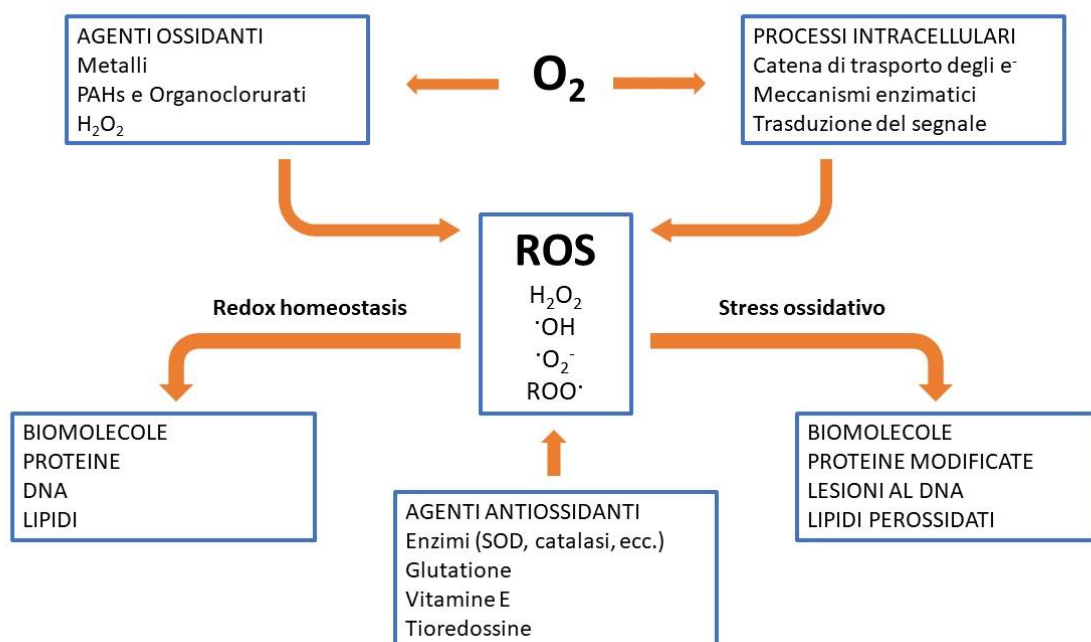
In aggiunta all'utilizzo dei parametri immunologici per determinare il possibile danno dato da un agente xenobiotico, l'ecotossicologia sfrutta anche altri *biomarkers* a livello enzimatico, per determinare eventuali stress di tipo ossidativo o meno.

### *1.6.1 Enzimi e molecole antiossidanti*

Le specie chimiche reattive dell'ossigeno (ROS) sono molecole come il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), il radicale idrossile ( $\cdot OH$ ), il radicale anione superossido ( $\cdot O_2^-$ ) e il radicale perossidico ( $ROO\cdot$ ), le quali sono molto reattive ed esercitano una forte azione ossidante su importanti strutture della cellula (Valavanidis et al., 2006; Livingstone, 2001). Negli organismi aerobi, il metabolismo basale della cellula produce normalmente questi composti, in organelli cellulari come i mitocondri o il reticolo endoplasmatico (Sheehan & McDonagh, 2008), oppure dall'azione battericida dei fagosomi e degli enzimi litici (Galloway & Depledge, 2001) (Figura 1.4). Per cui, la produzione regolata di queste specie reattive fa parte del metabolismo aerobio della cellula, e il mantenimento di un equilibrio dei processi di ossidoriduzione (*redox homeostasis*) ad esse annessi è fondamentale per la salute dell'organismo (Valavanidis et al., 2006). Durante i processi metabolici, tuttavia, una piccola parte (2-3%) di questi radicali liberi può uscire dalle sedi normalmente adibite a queste reazioni e andare a reagire con strutture cellulari, originando un cosiddetto danno ossidativo (Valavanidis et al., 2006). I sistemi biologici hanno sviluppato così una serie di molecole ed enzimi con capacità antiossidanti, in grado di reagire alle ROS e di prevenire i danni ossidativi (Valavanidis et al., 2006) (Figura 1.4). Questi agenti con capacità antiossidanti possono essere enzimi (ad es. catalasi e superossido dismutasi), piccole molecole (ad es.



glutazione e vitamina E) e redossine (ad es. tioredossine) (Sheehan & McDonagh, 2008). Lo squilibrio tra la produzione e la neutralizzazione delle ROS nella cellula è chiamato stress ossidativo, ed è diventato un importante parametro di valutazione in tossicologia ambientale (Valavanidis et al., 2006) (Figura 1.4). Difatti, è ampiamente dimostrato come alcuni inquinanti e xenobiotici possano causare una maggior produzione di ROS, superando le capacità antiossidanti della cellula e causando un danno ossidativo (Valavanidis et al., 2006; Livingstone, 2001; Kaloyianni et al., 2009). Da questo, si comprende come la variazione delle attività di queste molecole ed enzimi antiossidanti possa essere un utile indice nella valutazione della tossicità di un contaminante ambientale.



**Figura 1.4** - Schema riassuntivo dell'origine e delle interazioni delle specie reattive dell'ossigeno nella cellula. Modificato da Sheehan & McDonagh (2008).

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 *Ruditapes philippinarum*

Il bivalve *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), conosciuto anche con il nome di vongola verace o vongola filippina, è un mollusco fossorio della famiglia dei Veneridi. Animale tipico di substrati sabbiosi di zone intertidali, estuari e lagune litorali, è originario dei mari del Sud-Est asiatico. Ha avuto un'elevata diffusione in Europa e Nord America per scopi commerciali e di allevamento e qui ora si è diffusa come specie invasiva (CABI, 2011). Possiede una conchiglia in carbonato di calcio, equivalve e con cerniera eterodonte, con un'altezza dai 19 ai 31 mm, e una lunghezza dai 25 ai 57 mm. I colori della conchiglia possono variare dal bianco, al giallo, al marrone chiaro e al grigio. La cavità palleale è relativamente grande, con margini interni lisci. L'attività fossoria viene esercitata con la protrusione del piede dalle valve, permettendo all'animale di insabbiarsi a 3-5 cm dalla superficie del sedimento. La sacca dei visceri si presenta di una tinta arancione e contiene diversi organi tra i quali le branchie, la ghiandola digestiva e la cavità pericardica con il cuore. Il sistema circolatorio è aperto e costituito da un tessuto fluido, l'emolinfa, le cui unità cellulari sono gli emociti: questi sono deputati al trasporto dell'emocianina e alle risposte immunitarie. La riproduzione in *R. philippinarum* è dioica, con fecondazione esterna. La stagione riproduttiva varia in base all'area geografica ed è influenzata da diversi fattori come la temperatura e la disponibilità di cibo. Dopo la fecondazione della cellula uovo, il nuovo individuo si schiude in una larva trocofora natante, per passare attraverso uno stadio di veliger chiamato D-larva e quindi in una larva pediveliger, prima di raggiungere lo stadio adulto (CABI, 2011).

Gli esemplari ( $4.6 \pm 0.5$  cm) utilizzati per questo lavoro sono stati pescati nel mese di settembre 2020 nel bacino della laguna di Venezia, vicino a Chioggia (VE). Dopo il trasporto in laboratorio, è stato eseguito l'acclimatamento per cinque giorni in acqua di mare in vasche munite di aerazione, all'interno di una stanza dedicata con temperatura di 16 °C. L'alimentazione degli animali, per il periodo di stabulazione e per tutto il periodo di esposizione, è costituita da una miscela di microalghe: *Tetraselmis chuii* e *Phaeodactylum tricorutum*.

### 2.2 Disegno sperimentale

Dopo la stabulazione, si è proceduto all'esposizione degli animali al galaxolide. La soluzione madre di galaxolide è stata preparata sciogliendo 50 mg di sostanza pura (Galaxolide®, LGC Standards S.r.l., Milano (MI), Italia) in 1 L di acetone. Sono state

predisposte sei vasche in totale: due per il controllo, due per una concentrazione di 100 ng/L e due per una concentrazione di 500 ng/L. Ogni vasca è stata riempita con 30 L di acqua di mare (salinità  $35 \pm 1$  psu), in assenza di sedimento (Figura 2.1). Sono stati poi aggiunti 45 esemplari di *R. philippinarum* per ciascuna vasca e quindi il contaminante in quantità tale da raggiungere le concentrazioni sopra riportate. Nel controllo è stato aggiunto acetone, ad una



**Figura 2.1** - Alcune delle vasche utilizzate per l'esposizione, con una parte degli esemplari di *Ruditapes philippinarum*.

concentrazione ( $10 \mu\text{L/L}$ ) corrispondente al volume di solvente presente alla più alta concentrazione di galaxolide testata ( $500 \text{ ng/L}$ ).

Le vasche sono state mantenute in stanza termostata a  $16 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ogni 48 h, l'acqua delle vasche è stata rinnovata, con successiva nuova aggiunta di contaminante per ripristinare le concentrazioni nominali. Gli animali sono stati nutriti con la miscela di alghe dopo ogni rinnovo dell'acqua. La durata totale dell'esposizione è stata di 21 giorni, con prelievo dei tessuti degli animali dopo 7, 14 e 21 giorni per le successive analisi biochimiche.

### **2.3 Prelievo dei tessuti**

Dopo 7, 14 e 21 giorni di esposizione al galaxolide, sono stati prelevati 12 animali per ogni vasca, ovvero 24 animali per trattamento (controllo,  $100 \text{ ng/L}$  e  $500 \text{ ng/L}$ ). Gli animali sono stati divisi in 6 *pool*, costituiti ciascuno da 4 esemplari. Ad ogni animale sono state prelevate branchie, ghiandola digestiva ed emolinfa (Figura 2.2).

L'emolinfa è stata prelevata con una siringa dal muscolo adduttore, e dopo aver costituito i *pool* è stata usata per le analisi del THC, diametro e volume degli emociti, proliferazione cellulare (XTT) e l'attività della lattato deidrogenasi (LDH) e del lisozima.

Dagli stessi animali da cui è stata prelevata l'emolinfa, sono state prelevate le branchie e la ghiandola digestiva. Per ogni condizione sperimentale e per ogni tempo, sono stati costituiti 6 *pool* dei due tessuti prelevati da 4 animali; ogni singolo *pool* è stato poi suddiviso in diverse aliquote da destinare alle analisi biochimiche. Tutte queste aliquote sono state immediatamente congelate in azoto liquido, e conservate in freezer a -20°C fino al momento dell'analisi.



**Figura 2.2** - Una fase del prelievo dei tessuti di *R. philippinarum*. È ben visibile la branchia, trattenuta dalle pinzette.

## 2.4 Parametri emocitari

L'emolinfa dei diversi *pool* è stata usata per determinare i diversi parametri cellulari immunologici, basati sugli emociti contenuti in questo tessuto. Ad eccezione dell'attività del lisozima, tutti gli altri parametri sono stati misurati nel tessuto fresco, cioè nell'emolinfa appena estratta dagli esemplari. Nelle analisi dove si è eseguita una determinazione spettrofotometrica, è stato usato uno spettrofotometro *Beckman Coulter 730*.

### 2.4.1 THC, diametro e volume cellulare

I valori di THC, diametro e volume degli emociti sono stati determinati per ogni *pool* con uno *Scepter™ 2.0 Automated Cell Counter* (Millipore, FL, USA): a 2 mL di diluente *Coulter Isoton*

sono stati aggiunti 20  $\mu\text{L}$  di emolinfa. Il valore di THC è stato espresso come  $n^\circ$  emociti  $\times 10^7/\text{ml}$  di emolinfa, il diametro cellulare in  $\mu\text{m}$  e il volume in picolitri (pL).

#### 2.4.2 Proliferazione cellulare (XTT)

Questo saggio è stato effettuato utilizzando l'apposito kit *Cell proliferation, kit II* (Roche). Il saggio si basa sulla conversione del sale di tetrazolio (XTT) in formazano, reazione catalizzata dall'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, con conseguente formazione di un prodotto di colore arancio. La quantità di formazano prodotto, misurata tramite lettura spettrofotometrica, è quindi correlata direttamente all'attività della deidrogenasi e, di conseguenza, al numero di cellule vitali.

Dopo il prelievo, a 400  $\mu\text{L}$  di emolinfa sono stati aggiunti 200  $\mu\text{L}$  della miscela di reazione, composta da 5 ml di *XTT labeling reagent* e 100  $\mu\text{L}$  di *electron-coupling reagent*, entrambi forniti dal kit. Per il bianco, sono stati utilizzati 400  $\mu\text{L}$  di acqua distillata ultrapura al posto dell'emolinfa e sempre 200  $\mu\text{L}$  di miscela di reazione. Tutti i campioni sono stati poi incubati al buio per cinque ore a temperatura ambiente, mescolandoli ogni ora. Infine, l'assorbanza è stata letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 450 nm. I risultati sono stati espressi come densità ottica su numero di emociti totali ( $\text{DO}_{450}/n^\circ$  emociti totali), questi ultimi determinati precedentemente con il THC. Questo saggio si rivela molto funzionale rispetto ad altri usati in passato che utilizzavano isotopi radioattivi. Inoltre, fornisce risultati in tempi brevi, ha una elevata sensibilità anche in presenza di poche cellule vitali, e i valori di assorbanza rilevati sono strettamente correlati al numero di cellule presenti.

#### 2.4.3 Lattato deidrogenasi (LDH)

L'enzima lattato deidrogenasi è un enzima citoplasmatico della classe delle ossidoreduttasi, con un ruolo chiave nel catalizzare l'interconversione del lattato a piruvato, con produzione di NADH. Viene utilizzato come saggio di citotossicità mediata da xenobiotici negli emociti, andando a determinare il rilascio dell'enzima nell'emolinfa; l'LDH viene infatti rilasciato all'esterno delle cellule in presenza di danni alla membrana cellulare e può essere rilevato, con tecnica colorimetrica, in campioni di emolinfa privi di cellule (Matozzo et al., 2012b). Per il saggio si utilizza l'apposito kit *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* (Roche), il quale contiene una miscela di diaforasi, enzimi che in presenza di NADH (prodotto dall'attività della LDH) catalizzano la conversione del sale di tetrazolio a formazano, con conseguente formazione di colore rosso, rilevabile per via spettrofotometrica.

Da ogni *pool* di emolinfa, 800  $\mu\text{L}$  sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti. Successivamente, a 500  $\mu\text{L}$  di supernatante privo di emociti sono stati aggiunti 500  $\mu\text{L}$  di miscela di reazione, preparata secondo le istruzioni fornite dal kit. Al precipitato invece, costituito da soli emociti, sono stati aggiunti 500  $\mu\text{L}$  di acqua deionizzata, determinando così la lisi delle cellule, e conservato a  $-20^\circ\text{C}$  per la successiva analisi dell'attività del lisozima nel lisato di emociti (§2.4.4). Tutti i campioni trattati con la miscela del kit sono stati quindi incubati per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Per il bianco sono stati utilizzati 500  $\mu\text{L}$  di acqua ultrapura al posto dell'emolinfa e la stessa quantità di miscela di reazione. Dopo il periodo di incubazione, l'assorbanza di ogni campione è stata letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 490 nm. I risultati ottenuti sono stati espressi come densità ottica ( $\text{DO}_{490}$ ).

#### 2.4.4 Lisozima

Il lisozima è un enzima con funzione litica presente all'interno dei lisosomi cellulari, deputato alla digestione di strutture *non-self* che vengano in contatto con gli emociti. Una maggior produzione di lisozima può significare l'induzione di una risposta immunitaria.

Del lisato cellulare ottenuto come precedentemente descritto (§2.4.3), a 50  $\mu\text{L}$  sono stati aggiunti 950  $\mu\text{L}$  di una sospensione di *Micrococcus lysodeikticus* allo 0.15% in tampone fosfato 66 mM, pH 5.8. Per i bianchi è stata usata la stessa quantità di tampone fosfato al posto del lisato. L'attività del lisozima è stata dunque misurata tramite un saggio spettrofotometrico secondo il metodo di Fisher et al. (1996), dove il decremento di assorbanza ( $\Delta A/\text{min}$ ) è stato letto a 450 nm per 5 min (intervallo di lettura di 30 sec) a temperatura ambiente (Fisher W.S. et al., 1996). Con l'ausilio di una curva di calibrazione ottenuta da concentrazioni standard di lisozima (1 - 2.5 - 5 - 10  $\mu\text{g}$  lisozima/mL tampone fosfato) sono stati infine determinati i valori, che sono stati espressi come  $\mu\text{g}$  lisozima/mg proteine, queste ultime determinate secondo il metodo di Bradford (1976).

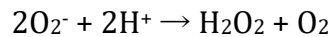
### 2.5 Attività di enzimi antiossidanti

Le aliquote di branchia e ghiandola digestiva prelevate dai diversi *pool* e conservate a  $-20^\circ\text{C}$ , sono state scongelate al momento dell'analisi. Ogni aliquota è stata omogeneizzata in 1 mL di tampone di omogeneizzazione, costituita da tampone TRIS-HCl 10 mM a pH 7.6, KCl 0.15 M, saccarosio 0.5 M, EDTA 1 mM e un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma-Aldrich). L'omogeneizzazione è stata eseguita in ghiaccio con un omogeneizzatore *Ultra-Turrax*

(*model T8 basic*, IKA). Dopo centrifuga a 12.000 giri a 4 °C per 30 min, i supernatanti (SN) sono stati prelevati per le diverse analisi.

### 2.5.1 Attività della SOD

La superossido dismutasi (SOD) è un metalloenzima antiossidante che catalizza la reazione di dismutazione del radicale superossido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), una specie ROS dannosa per la cellula, a perossido d'idrogeno e ossigeno, secondo la reazione (Crapo et al., 1978):

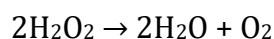


La determinazione dell'attività di questo enzima è stata eseguita con il saggio indiretto perfezionato da Crapo et al. (1978), che utilizza come reagenti ipoxantina, xantina ossidasi e citocromo c. La xantina ossidasi reagisce con l'ipoxantina, e dall'ossidazione di questa si produce radicale superossido. Questo va a ridurre il citocromo c, determinando una variazione del suo naturale colore rosso rilevabile allo spettrofotometro. La presenza di SOD, invece, porta alla degradazione del radicale superossido, il quale non va a reagire con il citocromo.

L'attività della SOD è stata misurata sia nella branchia che nella ghiandola. Le soluzioni di reagenti sono state preparate al momento del saggio: soluzione di ipoxantina 13 mM in NaOH 1 N; soluzione di xantina ossidasi 20 U/ml in acqua distillata; tampone fosfato 50 mM pH 8.6 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), EDTA 0.1 mM,  $\text{NaN}_3$  1mM; e soluzione di citocromo c 1.6 mM in tampone fosfato. In ogni cuvetta sono stati aggiunti: 930  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato, 20  $\mu\text{L}$  di ipoxantina, 10  $\mu\text{L}$  di citocromo c, 30  $\mu\text{L}$  di SN, e 10  $\mu\text{L}$  di xantina ossidasi. Per i bianchi, al posto del SN sono stati utilizzati 30  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato. L'assorbanza è stata letta a 550 nm per 1 min (intervallo di misura di 10 sec), con un intervallo di lettura di 30 sec. I risultati sono stati espressi come unità di enzima U SOD/mg di proteine. Una unità di SOD è definita come la quantità di campione che produce il 50% di inibizione del tasso di riduzione del citocromo c in specifiche condizioni di saggio. I mg di proteine del SN sono stati determinati con il metodo di Bradford (1976).

### 2.5.2 Attività della CAT

La catalasi (CAT) è un enzima antiossidante che catalizza la conversione del perossido di idrogeno ad ossigeno ed acqua, secondo la reazione (Aebi, 1984):



Nella cellula, la CAT lavora in sinergia con la SOD: quest'ultima produce perossido di idrogeno come visto in precedenza (§2.5.1), il quale è una specie ROS ossidante, possibilmente dannosa per la cellula. La CAT dunque agisce neutralizzando il perossido di idrogeno, e dando prodotti innocui. L'attività della CAT nei tessuti è stata determinata secondo il metodo proposto da Aebi (1984), basato sulla degradazione da parte dell'enzima di una quantità nota di un substrato contenente perossido di idrogeno, e misurata allo spettrofotometro.

L'attività della CAT è stata misurata sia nella branchia che nella ghiandola. Il substrato per la reazione è stato preparato al momento del saggio, aggiungendo 150 µL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% in 50 mL di tampone fosfato 50 mM pH 7 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O). Allo spettrofotometro, in cuvetta al quarzo sono stati aggiunti nell'ordine: 620 µL di tampone fosfato, 350 µL di substrato, e 30 µL di SN. Per i bianchi, al posto del SN sono stati aggiunti 30 µL di acqua distillata. La lettura è stata effettuata a 240 nm per 1 min (intervallo di misura di 10 sec), con un intervallo di lettura di 30 sec. I risultati sono stati espressi come unità di enzima U CAT/mg di proteine, dove un'unità di enzima corrisponde alla quantità di CAT in grado di decomporre 1 µmol di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al minuto. La concentrazione proteica del SN è stata determinata con il metodo di Bradford (1976).

### 2.5.3 Attività della GR

Il glutatione (GSH) è un tripeptide con importanti funzioni antiossidanti, prodotto dalla cellula per neutralizzare le specie ROS (Smith et al., 1988). Nel fare ciò, il glutatione passa al suo stato ossidato (GSSG). L'enzima glutatione reduttasi (GR), utilizzando il NADPH, riporta il GSSG al suo stato ridotto, andando così a ricostituire le riserve di GSH:



Il metodo utilizzato per determinare l'attività della GR è quello proposto da Smith et al. (1988), dove si utilizza l'enzima per trasformare il GSSG in GSH, impiegando il NADPH. Il GSH originato viene fatto reagire con l'acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB), dando come prodotto l'acido 2-nitro-5-tiobenzonico (TNB). Quest'ultimo dà un colore giallo, rilevabile grazie ad un incremento di assorbanza alla lunghezza d'onda di 412 nm. L'aumento dell'assorbanza è direttamente proporzionale all'attività della GR.

L'attività della GR è stata determinata sia nella branchia che nella ghiandola. I reagenti utilizzati sono stati: tampone fosfato 100 mM pH 7.5 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O), EDTA 1 mM; soluzione di NADPH 2 mM in tampone fosfato; soluzione di GSSG 2 mM in tampone



fosfato; e soluzione di DTNB 3 mM in tampone fosfato. In cuvetta sono stati aggiunti, nell'ordine: 250  $\mu$ L di soluzione GSSG, 50  $\mu$ L di tampone fosfato, 50  $\mu$ L di SN, 125  $\mu$ L di soluzione DTNB, e 25  $\mu$ L di soluzione NADPH. Per i bianchi, al posto del SN sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di tampone fosfato. Dopo un tempo di attesa di 60 sec, la lettura dell'assorbanza è stata effettuata a 412 nm per 3 min (intervallo di misura di 30 sec), con un intervallo di lettura di 60 sec. I risultati sono stati espressi come unità di enzima U GR/mg di proteine. Un'unità di GR è definita come la quantità di enzima che causa la riduzione di 1.0  $\mu$ mol di DTNB a TNB a 25 °C. I mg di proteine totali del SN sono stati determinati con il metodo di Bradford (1976).

#### *2.5.4 Attività della GST*

Le glutatione S-transferasi (GST) sono una famiglia di isoenzimi detossificanti citosolici e microsomiali che catalizzano la coniugazione di varie molecole tossiche con il GSH, rendendole meno reattive e più facilmente eliminabili dall'organismo (Habig et al., 1974). Per la determinazione dell'attività di questa famiglia di enzimi, si è seguito il metodo sviluppato da Habig et al. (1974), dove il 2,4-dinitroclorobenzene (CDNB) viene fatto reagire con il GSH grazie all'ausilio delle GST. In seguito alla coniugazione dei gruppi tiolici del GSH al CDNB, vi è un aumento dell'assorbanza a 340 nm. L'aumento dell'assorbanza è direttamente proporzionale all'attività delle GST.

L'attività della GST è stata determinata solo nella ghiandola digestiva, poiché sono principalmente enzimi epatici nei vertebrati. Sono stati quindi preparati i reagenti per l'analisi: tampone fosfato 0.1 M pH 6.5 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ); soluzione di CDNB 20 mM in etanolo assoluto; e soluzione di GSH 0.1 M in acqua distillata. Tutte le soluzioni sono state incubate per 30 min a 37°C prima del saggio. La reazione è stata fatta avvenire nelle cuvette al quarzo, aggiungendo i reagenti nell'ordine: 50  $\mu$ L di soluzione CDNB, 840  $\mu$ L di tampone fosfato, 10  $\mu$ L di SN, e 100  $\mu$ L di soluzione GSH. Per i bianchi, sono stati utilizzati 10  $\mu$ L di tampone fosfato al posto del SN. L'incremento di assorbanza è stato letto a 340 nm per 1 min (intervallo di misura di 10 sec), con un intervallo di lettura di 30 sec. L'attività della GST è stata espressa come nmol/min/mg proteine.

## **2.6 PCC**

La carbonilazione delle proteine, ovvero la formazione di gruppi carbonilici nelle loro catene laterali, è un danno ossidativo causato da agenti con forte potere ossidante, come ad esempio i ROS. La determinazione dei gruppi carbonilici nelle proteine (*Protein Carbonyl Content*, PCC) può quindi essere un indicatore dello stress ossidativo subito dall'organismo (Mecocci

et al., 1999). Il contenuto di PCC è stato determinato seguendo il saggio proposto da Mecocci et al. (1999), basato sulla reazione del gruppo carbonile -CO con la 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH). Questa interazione dà luogo ad un addotto cromoforo, l'idrazone, che può essere determinato per via spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 370 nm. La quantificazione dell'idrazone è così legata alla quantità presente di gruppi carbonilici.

I livelli di PCC sono stati determinati sia nella ghiandola che nelle branchie. Prima di ogni analisi sono state preparate le soluzioni di reagenti: soluzione di DNPH 10 mM in HCl 2 M; soluzione di guanidina 6 M in acqua deionizzata; soluzione di etanolo/etil-acetato 1:1; e soluzione di acido tricloroacetico (TCA) 30% in acqua deionizzata. Prima dell'analisi, i campioni sono stati processati nella seguente maniera: a 250 µL di SN sono stati aggiunti 250 µL di DNPH (per i bianchi, al posto del DNPH sono stati aggiunti 250 µL di HCl 2 M). Tutti i campioni sono stati agitati e lasciati ad incubare per 1 ora, al buio a temperatura ambiente, mescolando ogni 10 min. Sono stati aggiunti 250 µL di TCA e mescolati, e lasciati ad incubare per 15 min a 4°C. Dopo centrifuga a 10.000 g per 15 min a 4°C, è stato eliminato il surnatante. Il precipitato è stato sciacquato delicatamente per tre volte con 750 µL di soluzione etanolo/etil-acetato e quindi sono stati aggiunti 500 µL di guanidina, avendo cura di non risospendere il precipitato. Dopo incubazione a 37 °C per 30 min, agitando delicatamente ogni 10 min, sono stati trasferiti in cuvetta al quarzo 350 µL di surnatante. La lettura allo spettrofotometro è stata così fatta a 370 nm con lunghezza d'onda fissa. I risultati sono stati espressi come nmol di proteine carbonilate/mg di proteine totali. I mg di proteine sono stati determinati con il metodo di Bradford (1976) sul SN di partenza.

## **2.7 Attività dell'AChE**

L'acetilcolina (ACh) è un importante neurotrasmettitore responsabile del segnale nervoso tra le giunzioni sinaptiche (Ellman et al., 1961). L'acetilcolinesterasi (AChE) è l'enzima responsabile della sua idrolisi, permettendo così di rimuoverla dal recettore di segnale e renderla disponibile per una nuova trasmissione. L'attività della AChE è stata determinata seguendo il protocollo sviluppato da Ellman et al. (1961), con l'acetiltiocolina (ATC) come substrato. Questa viene convertita dall'enzima in tiocolina e acetato. La tiocolina viene poi fatta reagire con DTNB e il prodotto TNB dà un colore giallo quantificabile allo spettrofotometro, come visto in precedenza (§2.5.3). L'aumento della colorazione è così riconducibile all'attività dell'enzima.

L'attività dell'AChE è stata determinata solamente nella branchia. I reagenti per l'analisi sono stati: soluzione di DTNB 0.75 mM in TRIS-HCl 0.1 M pH 7.2, e soluzione di ATC 3 mM in

acqua deionizzata. La reazione è stata fatta avvenire in micropiastrea, aggiungendo 100 µL di DTNB a 25 µL di SN, ed incubando per 5 min (per i bianchi sono stati aggiunti, al posto del SN, 25 µL di acqua deionizzata). Poi sono stati aggiunti 25 µL di ATC e incubati per 10 min. La misura è stata fatta al lettore di micropiastre Optic Ivymen System (Biotech, Spagna) a 405 nm, con due letture: una al tempo 0 e una dopo 5 min con una prima lettura finita l'incubazione e una seconda lettura 5 min dopo. I risultati dell'attività della AChE sono stati espressi come nmol/min/mg proteine.

## **2.8 Analisi statistica**

Poiché gli assunti per l'ANOVA (distribuzione normale e omogeneità delle varianze) erano soddisfatti, i risultati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie, seguita da un test post-hoc (test HSD di Tukey) per i confronti a coppia. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante il software STATISTICA 13.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). I risultati sono stati espressi come media ± errore standard.

## **2.9 Analisi del galaxolide nell'acqua di mare**

L'acqua marina utilizzata nel disegno sperimentale di questo lavoro è stata prelevata nell'estate 2020 presso Punta Poli (coordinate: 45°13'19.3"N 12°17'05.2"E; Chioggia, VE, Italia) con autocisterna, durante il momento di marea entrante. L'acqua è stata dunque trasportata e stoccata nelle cisterne adibite nel piano seminterrato del Complesso Interdipartimentale A. Vallisneri dell'Università degli Studi di Padova. Un sistema di pompaggio permette di richiamare l'acqua direttamente nei rubinetti della stanza termostata dove è stato condotto l'esperimento. Qui sono stati prelevati due campioni da 100 mL a volta (a 7, 14 e 21 gg per considerare eventuali differenze temporali nella cisterna interrata) per un totale di 6 campioni, quindi sono stati immediatamente congelati e conservati a -20°C fino a poco prima dell'analisi. Dopo scongelamento, ad ogni campione da 100 mL sono stati aggiunti 100 µL di Tonalide-D<sub>3</sub> 100 µg/L in acetone come standard interno (IS, *internal standard*) poco prima dell'estrazione. Per ogni estrazione di campioni, è stato estratto anche un bianco costituito da sola acqua deionizzata con aggiunta della stessa quantità di IS.

### **2.9.1 Reagenti**

Lo standard utilizzato per preparare le soluzioni di riferimento è stato galaxolide allo stato solido (Galaxolide® ≥98%; LGC Standards S.r.l., Milano (MI), Italia). Lo standard utilizzato per preparare la soluzione di IS alla concentrazione di 100 µg/L in acetone è stato tonalide

deuterato (D<sub>3</sub>) allo stato solido (Tonalide®-D<sub>3</sub> ≥98%; Sigma-Aldrich, Germania). I solventi utilizzati sono stati acetone (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> ≥99.9%; Carlo Erba, Italia), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ≥99.9%; Merck, Germania), n-esano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> ≥99%; Honeywell, Germania), etil-acetato (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> ≥99.5%; Sigma-Aldrich, Francia) e metanolo (CH<sub>3</sub>OH ≥99.9%; Carlo Erba, Italia). L'acqua deionizzata (18.2 MΩ·cm) è stata prodotta con un sistema di purificazione Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA). L'acqua di mare artificiale usata per preparare le soluzioni di standard è stata Synthetic Sea Water ASTM D1141-98 (ReAgent, UK).

### 2.9.2 Estrazione dei campioni d'acqua

Per preconcentrare i campioni e renderli idonei per l'analisi strumentale, i campioni d'acqua sono stati estratti con il metodo SPE (*Solid Phase Extraction*) proposto da Villa et al. (2012), con leggere modifiche. Le cartucce utilizzate per l'estrazione sono state le OASIS HLB 3cc (60mg) (Waters, Irlanda), condizionate al Manifold con 2 mL di n-esano, 2 mL di etil-acetato, 2 mL di metanolo e infine 4ml di acqua deionizzata (Milli-Q). Dopo il condizionamento, sono stati estratti i campioni mediante vuoto ad un flusso di circa 3 mL al minuto. Dopo successivo lavaggio con 4 mL di acqua deionizzata, le cartucce sono state asciugate all'aria per 15 min. L'eluizione è stata quindi eseguita con 4 mL di n-esano e 2 mL di etil-acetato, per gravità. La concentrazione dell'estratto è stata condotta sotto flusso di azoto, fino quasi a secco. Il preconcentrato è stato quindi recuperato con 200 µL di acetone, trasferito in micro-vial ed analizzato al gascromatografo (GC).

### 2.9.3 GC-MS

L'analisi dei campioni estratti è stata eseguita con un gascromatografo Trace 1300 (Thermo Fisher Scientific, Germania) con rilevatore uno spettrometro di massa triplo quadrupolo (QqQ-MS). Il volume di iniezione è stato di 1 µL, eseguito con iniettore automatico AI 1310 (Thermo Fisher Scientific, Germania) in modalità *splitless*, con temperatura dell'inlet a 280°C, ed elio come gas carrier alla pressione costante di 0.8 mL/min. La separazione cromatografica è avvenuta in una colonna capillare SLB - 5ms (FUSED SILICA Capillary Colum, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness; Supelco, Sigma Aldrich, Germania). La rampa programmata del forno è stata: 2 min a 50°C, seguita da un incremento a 20°C/min fino a 190°C, quindi 5°C/min fino a 230°C e infine 15°C/min fino a 320°C, dove è stata mantenuta per 4 min. Il tempo totale di corsa è stato dunque di 27 min. La transfer line è stata regolata alla temperatura di 270°C.

Lo spettrometro di massa (MS, *mass spectrometer*) è stato un triplo quadrupolo TSQ 8000 EVO (Thermo Scientific) con sorgente EI (*electron ionization*) a 70 eV. La temperatura della sorgente è stata impostata a 290°C, con elio come gas carrier. L'analisi è stata condotta in SRM (*Single Reaction Monitoring*) con la selezione di tre frammenti, uno per la quantificazione e due per la selettività: per il galaxolide, il frammento a 243 *m/z* è stato usato per l'analisi quantitativa, mentre i frammenti a 213 *m/z* e 171 *m/z* sono stati usati per l'analisi qualitativa; per il tonalide-D<sub>3</sub> usato come IS, il frammento a 190 *m/z* è stato usato per l'analisi quantitativa, mentre i frammenti a 191 *m/z* e 189 *m/z* sono stati usati per l'analisi qualitativa.

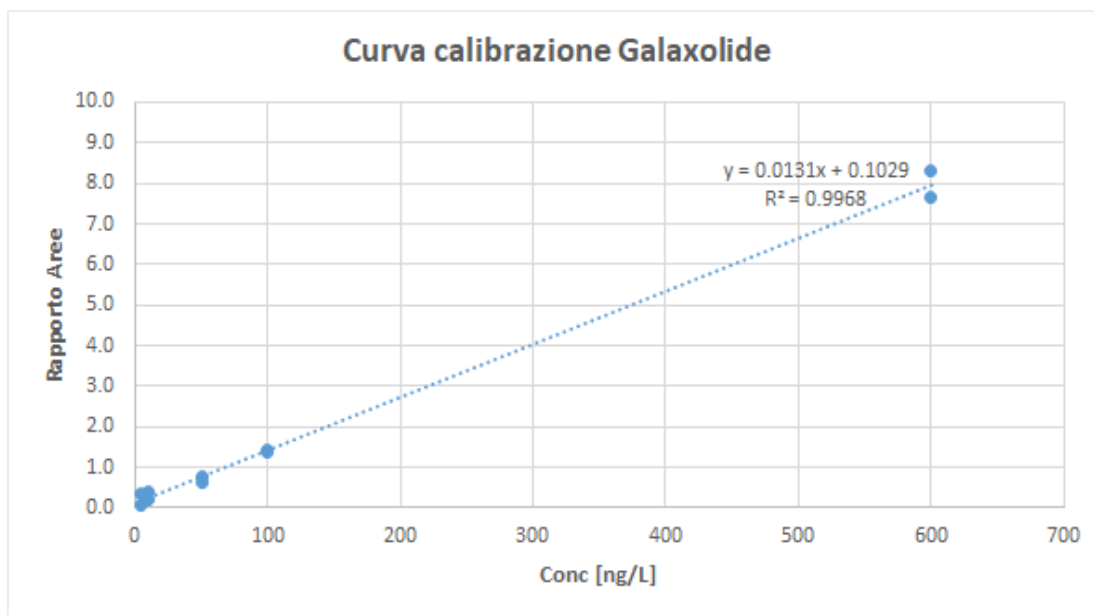
Per l'analisi dei campioni d'acqua al GC-MS, i parametri dello strumento sono stati regolati con il programma Chromeleon 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Germania). I dati ottenuti (cromatogrammi e spettri di massa) sono stati processati con lo stesso programma, mentre il database di riferimento usato per l'adeguato *match* degli spettri di massa è NIST Database (NIST, MD, USA).

#### 2.9.4 Validazione del metodo

La linearità della risposta strumentale è stata valutata preventivamente su soluzioni standard di galaxolide a diverse concentrazioni (2.5, 5, 25, 50 e 300 µg/L) in acetone, con una buona risposta lineare dello strumento ( $R^2 > 0.99$ ).

La curva di calibrazione è stata poi costruita più appropriatamente nella matrice di interesse, con soluzioni standard di galaxolide a diverse concentrazioni (5, 10, 50, 100 e 600 ng/L) in acqua di mare sintetica. La curva di calibrazione così costruita compensa l'eventuale inaccuratezza dovute all'estrazione. A questi standard di calibrazione è stato aggiunto l'IS (100 µL della soluzione a 100 µg/L) ed è stata eseguita l'estrazione con il metodo SPE illustrato sopra (§2.9.2). Il segnale di risposta dello strumento è stato indicato come Area del picco cromatografico (A). I valori delle A dei picchi sono stati normalizzati sulle A dell'IS ( $A_{IS}$ ), e poi ne è stato sottratto il rapporto dell'A del bianco su l'A dell'IS ( $A_{bianco}/A_{IS}$ ) dato dal valore di fondo del laboratorio (illustrato più avanti). Per verificare la precisione del metodo, intesa come riproducibilità, la retta di calibrazione in matrice è stata eseguita in duplicata, ed iniettata prima e dopo l'analisi dei campioni in giorni diversi. Questa è stata utilizzata come

retta di regressione per determinare le concentrazioni di galaxolide nei campioni, con interpolazione del segnale rilevato dallo strumento ( $R^2 = 0.9968$ ) (Figura 2.3).



**Figura 2.3** - Curva di calibrazione del galaxolide ottenuta da estrazione e analisi di diverse soluzioni standard (5, 10, 50, 100 e 600 ng/L) in acqua deionizzata. La linea di tendenza è il risultato della media delle linee di tendenza di due diverse curve di calibrazione eseguite a quattro giorni di distanza l'una dall'altra. Il Rapporto delle aree dei picchi cromatografici (A) è stato ottenuto come:  $(A_{\text{campione}}/A_{\text{IS}}) - (A_{\text{bianco}}/A_{\text{IS}})$ . L'analisi è stata eseguita con GC-MS in modalità SRM.

L'accuratezza è il grado di accordo tra un valore ottenuto sperimentalmente (media di diverse repliche dell'analisi) e il valore nominale di riferimento (Moosavi & Ghassabian, 2018). L'accuratezza dell'intero metodo di estrazione ed analisi è stata valutata come percentuale di recupero, confrontando l'estrazione di soluzioni a concentrazione nota di galaxolide in acqua di mare sintetica con i rispettivi standard preparati in acetone. La percentuale di recupero è stata determinata come  $(A_{\text{soluzioni}}/A_{\text{standard}}) \times 100$ . Si è ottenuto così un recupero del 80.4% (%RSD 9.7, n=4) per il galaxolide secondo il metodo utilizzato (Appendice A). Allo stesso modo, è stata valutata la percentuale di recupero dell'IS ottenendo un valore di 85.2% (%RSD 11.8, n=4) (Appendice A). Nella validazione del metodo analitico, l'effetto matrice è indicato come la capacità di altri componenti presenti nella matrice del campione di interferire con la determinazione dell'analita (Moosavi & Ghassabian, 2018). In spettrometria di massa in particolare, è dovuta alla soppressione o alla induzione della ionizzazione dell'analita, data appunto dai componenti della matrice (Moosavi & Ghassabian, 2018). Per poter determinare un eventuale effetto matrice all'interno del campione estratto, si è dovuto prima verificare che non vi fosse una contaminazione all'interno dell'ambiente di

laboratorio, dato il largo uso del galaxolide sia nei prodotti di pulizia che nei prodotti per la persona (Rainieri et al., 2017; Brausch & Rand, 2011). Sono state dunque eseguite delle estrazioni di sola acqua deionizzata con aggiunta di IS (100 µL) per definire un eventuale valore di fondo del laboratorio (bianco laboratorio). Le estrazioni sono state eseguite in diversi giorni per definire anche la riproducibilità del valore di fondo del laboratorio. Si è ottenuto così un valore di  $A_{\text{bianco}}/A_{\text{IS}} = 0.2790$  (%RSD 16.2, n=4), il quale è stato sottratto al rapporto delle aree della curva di calibrazione per ottenerne una correzione. Dalla retta di regressione così corretta, è stato determinato che il valore di fondo del galaxolide nel laboratorio è equivalente al segnale dato da una concentrazione di 13.4 ng/L (Appendice B).

Il valore del bianco è stato anche utilizzato per determinare i valori di LOD (Limit of detection) e LLOQ (Lower limit of quantification) del metodo. Il LOD è definito come la più piccola quantità di analita che può essere rilevata da un particolare metodo analitico. In questo studio, il LOD è stato calcolato come la concentrazione corrispondente ad un segnale di tre volte la deviazione standard del bianco (Moosavi & Ghassabian, 2018), ottenendo un valore di 2.5 ng/L. Il LLOQ è invece la più bassa concentrazione di un analita che può essere quantificata con una certa affidabilità all'interno di un campione (Moosavi & Ghassabian, 2018). In questo studio, il valore di LLOQ è stato calcolato come la concentrazione corrispondente ad un segnale di dieci volte il segnale dato dalla deviazione standard bianco. Per cui, si è ottenuto un valore di LLOQ di 26.7 ng/L (Appendice B).

La selettività del metodo, definita come la capacità di determinare uno specifico analita senza interferenze date da altri componenti di una matrice complessa (Moosavi & Ghassabian, 2018), è stata assicurata con l'utilizzo di uno spettrometro di massa triplo quadrupolo come rilevatore, lavorando in modalità SRM come illustrato al §2.9.3, unitamente al confronto dei tempi di ritenzione (galaxolide,  $t_r = 14.36$  min; tonalide- $D_3$ ,  $t_r = 14.43$  min).

## **2.10 Analisi di *screening* di potenziali contaminanti nelle vongole e nell'acqua di mare**

L'analisi *screening* è un tipo di analisi condotta in una determinata matrice con una ricerca a tappeto di tutti gli analiti rilevabili, senza discriminazione (*untarget*). Gli esemplari utilizzati per l'analisi *screening untarget* dei contaminanti accumulati nelle vongole *R. philippinarum* sono stati quelli al tempo disponibili presso il Complesso Interdipartimentale A. Vallisneri dell'Università degli Studi di Padova, ovvero provenienti dalla medesima battuta di pesca degli animali utilizzati per l'esposizione al galaxolide. Questi, quindi, sono rimasti per circa

30 gg all'interno della stanza termostata a 16°C, con ricambio di acqua della cisterna ogni 2 gg e alimentati con una miscela di alghe *Tetraselmis chuii* e *Phaeodactylum tricornutum*.

L'acqua di mare analizzata alla ricerca di contaminanti in modalità *untarget* è proveniente dalla medesima cisterna utilizzata per prelevare l'acqua di esposizione (§2.9). Sono stati prelevati tre campioni d'acqua da 100 mL (denominati W1, W2 e W3) e congelati a -20°C fino al momento dell'analisi.

### 2.10.1 Reagenti

Lo standard utilizzato per preparare la soluzione di IS (1 g/L in metanolo) per l'analisi HPLC-HRMS è stato celestolide allo stato solido (Celestolide® 98%; Sigma-Aldrich, Germania). I solventi utilizzati sono stati acetone (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> ≥99.9%; Carlo Erba, Italia), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ≥99.9%; Merck, Germania), n-esano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> ≥99%; Honeywell, Germania), etil-acetato (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> ≥99.5%; Sigma-Aldrich, Francia), metanolo (CH<sub>3</sub>OH ≥99.9%; Carlo Erba, Italia) e acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN ≥99.95%; Carlo Erba, Italia). Per acidificare le soluzioni è stato utilizzato acido formico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ≥98%; Sigma-Aldrich, Finlandia). Come composti solidi sono stati usati idrossido di sodio (NaOH 99%; BDH, Inghilterra) e ammonio solfato ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 99%; Sigma-Aldrich, Germania). L'acqua deionizzata (18.2 MΩ·cm) è stata prodotta con un sistema di purificazione Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA).

### 2.10.2 Pretrattamento ed estrazione dei campioni

Quindici esemplari di *R. philippinarum* sono stati divisi in 3 *pool* da 5 individui l'uno (denominati Pool1, Pool2 e Pool3). Per ogni *pool*, le vongole sono state private del guscio e i corpi interi (*whole body*) sono stati omogeneizzati con 10 mL di acqua deionizzata. L'omogeneizzato risultante è stato diviso in cinque aliquote delle quali una sola è stata subito estratta, mentre le rimanenti sono state conservate in congelatore a -20°C come riserva. Ad ogni aliquota per ciascun *pool*, dunque, è stato aggiunto l'IS (20 µL della soluzione a 1 g/L), e quindi pretrattata con 5 mL di acido formico all'1% in acqua deionizzata. Dopo aver agitato, le aliquote sono state centrifugate a 4900 rpm per 30 min e ne sono stati recuperati i surnatanti. A questi sono state aggiunte circa 4 gocce di idrossido di sodio 10 M fino ad arrivare a pH neutro con cartina tornasole. Sono stati poi aggiunti circa 0.82 g di solfato d'ammonio per eseguire il *salting out*, secondo metodica illustrata da Duong-Ly & Gabelli (2014). In questo modo si è potuto precipitare ulteriormente le proteine solubili presenti nel surnatante (Duong-Ly & Gabelli, 2014). Dopo agitazione, le aliquote sono state nuovamente centrifugate a 4900 rpm per 30 min, per poi recuperarne i surnatanti e porli in matracci da



100 mL. Dopo aver portato a volume con acqua deionizzata, è stata eseguita l'estrazione SPE con cartucce Hypersep Retain – PEP 200mg (Thermo Fisher Scientific, TN, USA). Il condizionamento delle cartucce è stato eseguito al Manifold con 4 mL di n-esano, 4 mL di etil-acetato, 4 mL di metanolo e infine 8 mL di acqua deionizzata. Dopodiché, sono stati estratti i campioni per mezzo del sottovuoto del Manifold, ad un flusso di circa 3 mL per minuto. Dopo lavaggio con 8 mL di acqua deionizzata, le cartucce sono state lasciate ad asciugare all'aria per 15 min. L'eluizione del campione è stata eseguita con 6 mL di n-esano, 4 mL di etil-acetato e 2 mL di metanolo, per gravità. La concentrazione dell'estratto è stata eseguita con flusso di azoto e riscaldamento a 40°C, fino quasi a secco. Il preconcentrato è stato quindi recuperato con 200 µL di metanolo e trasferito in micro-vial per le successive analisi.

L'estrazione dei campioni d'acqua è avvenuta alla stessa maniera di quanto indicato al §2.9.2 tranne per il recupero finale del preconcentrato, il quale è stato recuperato con 200µL di metanolo anziché acetone. Per un errore operativo, il campione W3 è risultato inutilizzabile ed è stato eliminato.

### 2.10.3 GC-MS e HPLC-MS

La parte di analisi strumentale dei *pool* di *R. philippinarum* è stata eseguita sia con il GC-MS che con la cromatografia HPLC-HRMS, per avere un ampio *screening* dei contaminanti. I campioni d'acqua di mare, invece, sono stati analizzati solamente in HPLC-HRMS. La corsa in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Thermo Fisher Scientific, Germania) è stata eseguita con colonna Kinetex Polar C18 (100 mm x 2.1 mm, 2.6 µm, 100 Å; Phenomenex, CA, USA) alla temperatura di 30°C. Come eluenti sono stati utilizzati 0.1% acido formico in acqua deionizzata per la fase acquosa (A), e 0.1% acido formico in acetonitrile per la fase organica (B). Il gradiente di eluizione dell'analisi è stato: 0–3 min, 2% B; 3–18min, 2% B-100% B; 18–20 min, 100% B; 20–21 min, 100% B-2% B; 21–30 min, 2% B. È stato utilizzato un flusso di 0.250 mL/min e il volume di iniezione è stato di 10 µL.

Dopo la cromatografia liquida, l'acquisizione è avvenuta con un HRMS (*High Resolution Mass Spectrometer*) Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Germania). Il flusso del gas ausiliario è stato impostato a 20 unità arbitrarie, e il voltaggio dello spray ESI (*Electrospray ionization*) a 2.80 kV. La temperatura del capillare e del gas ausiliario erano di 320°C e 360°C rispettivamente. L'acquisizione degli spettri di massa è avvenuta in modalità FS-ddMS<sup>2</sup> (*Full scan - data dependent MS/MS fragmentation*), con un range di massa in FS di 200-2000 *m/z*, e una finestra di 4 *m/z*. L'energia di collisione è stata impostata a 35 eV e la ionizzazione è

stata eseguita prima in positivo e poi in negativo. La risoluzione per l'acquisizione in FS è stata di 35000, mentre per l'acquisizione in ddMS<sup>2</sup> è stata di 17500.

Il programma utilizzato per la gestione dello strumento e per l'analisi dei dati è stato XCalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Per processare i dati per l'analisi screening, è stato usato il software Compound Discoverer (versione 3.2, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). I database di riferimento selezionati per il match degli spettri MS e MS/MS sono stati mzCloud (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), ChemSpider (Royal Society of Chemistry, DC, USA) e Mass List Compound Database (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

L'analisi in GC-MS è avvenuta con gli stessi parametri e la stessa rampa utilizzati per l'analisi dei campioni d'acqua (§2.9.3), con unica differenza il metodo di acquisizione del MS. Per eseguire l'analisi *untarget* dei contaminanti, l'acquisizione è stata condotta in modalità FS (*Full scan*) con intervallo di lettura di 50-550 m/z (*scan time* di 0.2 sec). Il confronto e il controllo del corretto match degli spettri di massa sono stati eseguiti manualmente con il database NIST (NIST, MD, USA).

#### 2.10.4 Validazione del metodo di screening in HPLC-HRMS

Il metodo qualitativo di *screening* è stato implementato nel corso del progetto di tesi. Per l'identificazione delle sostanze incognite è stata utilizzata l'alta selettività data dal MS Orbitrap, unitamente alla combinazione di *match* tra tre diversi database di riferimento, per ottenere dei risultati con un certo grado di affidabilità. Un composto è stato ritenuto positivamente identificato solamente quando la sua presenza è stata rilevata all'interno di tutti e tre i campioni delle aliquote dei tre *pool*, con segnali significativamente distinguibili dal bianco. In aggiunta, si è considerato solo quei composti con *match* positivi minimo del 90% con il database mzCloud. Come intensità dei segnali, si è voluto mantenere un elevato standard non considerando quei composti che, seppur positivi al *match*, non davano un segnale di risposta dello strumento superiore a 10<sup>5</sup> counts/min. L'analisi qualitativa *untarget* dei contaminanti presenti è stata assicurata nella sua elevata selettività attraverso l'acquisizione degli spettri in modalità FS-ddMS<sup>2</sup>, possibile grazie all'HRMS Orbitrap utilizzato. Tutti questi criteri imposti (SDLs, *screening detection limits*) sono stati scelti per avere comunque una buona affidabilità del metodo sviluppato all'interno del presente lavoro.

Una stima delle percentuali di recupero del metodo di estrazione è stata valutata confrontando la risposta dell'IS dei campioni dopo estrazione, con il segnale dato da uno standard di IS a 100 mg/L. In questo modo, si è ottenuto un recupero di circa 1%,

corrispondente a circa una concentrazione di 1 mg/L di IS. Comunque, anche con una percentuale di recupero così bassa, si è ottenuto un segnale dell'IS pari a circa  $10^7$  counts/min, ben al di sopra dei limiti di rilevabilità dello strumento.

Non avendo perfezionato un'analisi di tipo quantitativo, i valori di LOD e di LLOQ del metodo non sono stati definiti, come anche non è stato necessario sviluppare una retta di calibrazione.

### 3. RISULTATI

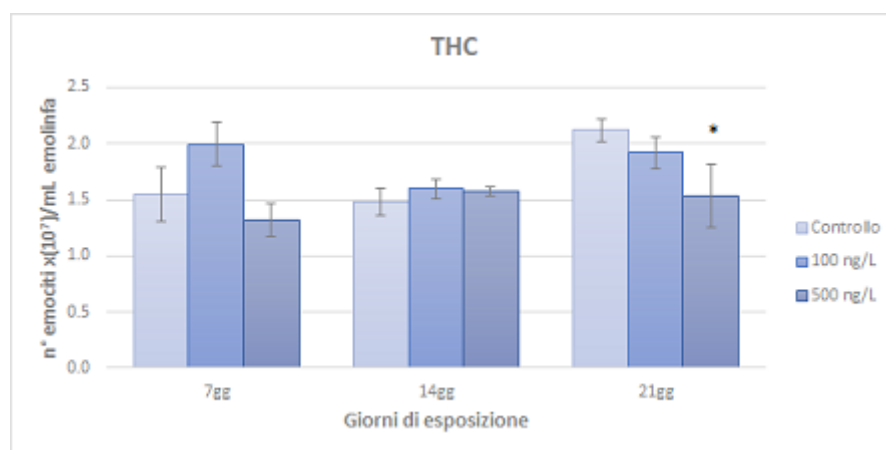
In appendice sono riportate le tabelle con i risultati delle analisi statistiche (ANOVA a due vie) di tutti i biomarker misurati. Nei grafici, sono stati inseriti gli asterischi solo se l'analisi dell'ANOVA a due vie evidenziava effetti statisticamente significativi delle variabili "trattamento" e "interazione tempo x trattamento", non del "tempo" di esposizione.

#### 3.1 Parametri emocitari

##### 3.1.1 THC, diametro e volume degli emociti

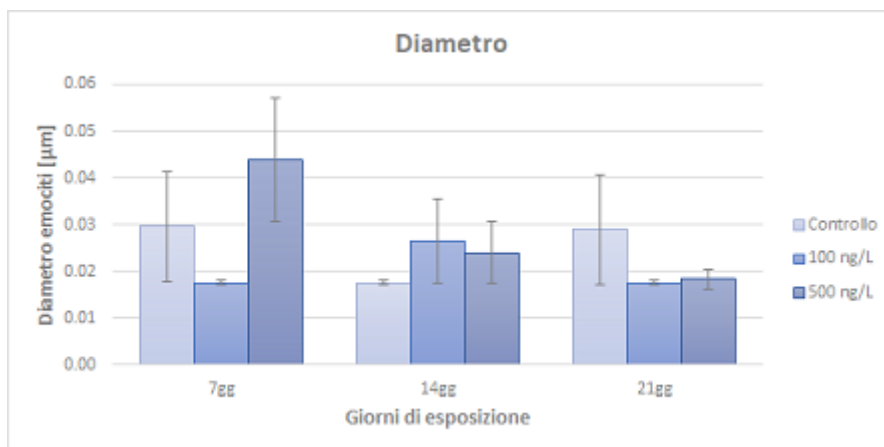
Per quanto riguarda i valori di THC, si osserva una variazione significativa ( $p < 0.05$ ) indotta dal trattamento, mentre non sono stati evidenziati rilevanti effetti del tempo di esposizione o dell'interazione tra il trattamento e il tempo (Appendice B).

In particolare, dal confronto a coppie tra le condizioni sperimentali effettuato con il test di Tukey è risultato che gli animali esposti a 500 ng/L per 21 gg hanno subito una riduzione significativa ( $p < 0.05$ ) del THC nell'emolinfa rispetto al controllo (Figura 3.1).

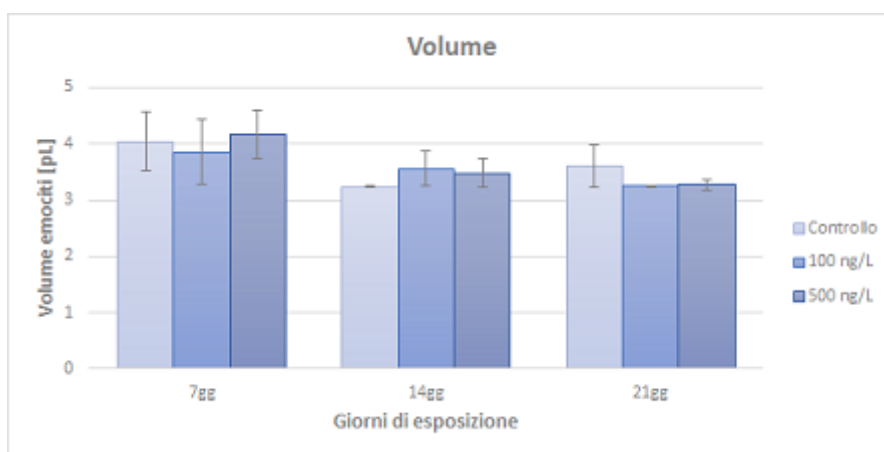


**Figura 3.1** - Valori di THC nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione, espressi come n° di emociti  $\times 10^7$  su mL di emolinfa. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard,  $n = 6$ . Gli asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo: \* $p < 0.05$ .

Per quanto riguarda sia il diametro che il volume degli emociti, non sono stati evidenziati effetti significativi del trattamento, del tempo di esposizione o dell'interazione tra i due (Figura 3.2 e 3.3) (Appendice B).



**Figura 3.2** - Diametro cellulare (espresso in  $\mu\text{m}$ ) degli emociti nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard,  $n = 6$ .

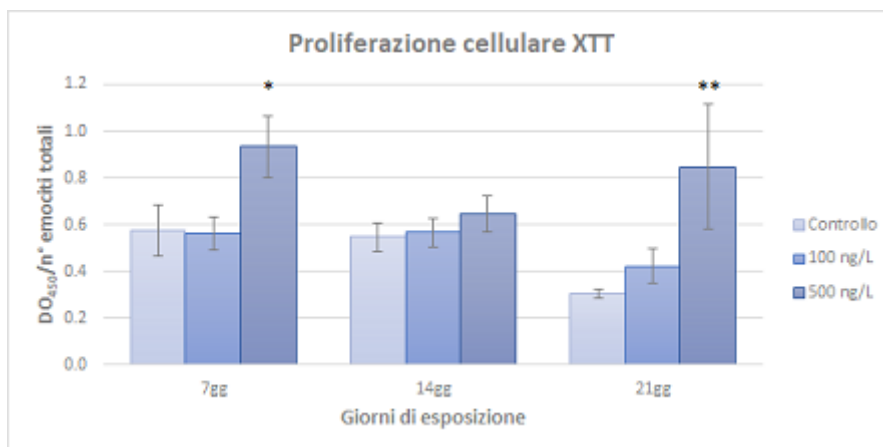


**Figura 3.3** - Valori di volume cellulare (espressi in pL) degli emociti nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard,  $n = 6$ .

### 3.1.2 XTT

Per quanto riguarda la proliferazione cellulare, è stato notato un effetto significativo ( $p < 0.01$ ) del trattamento, mentre non è stata registrata nessuna variazione dovuta al tempo di esposizione o all'interazione trattamento x tempo (Appendice B).

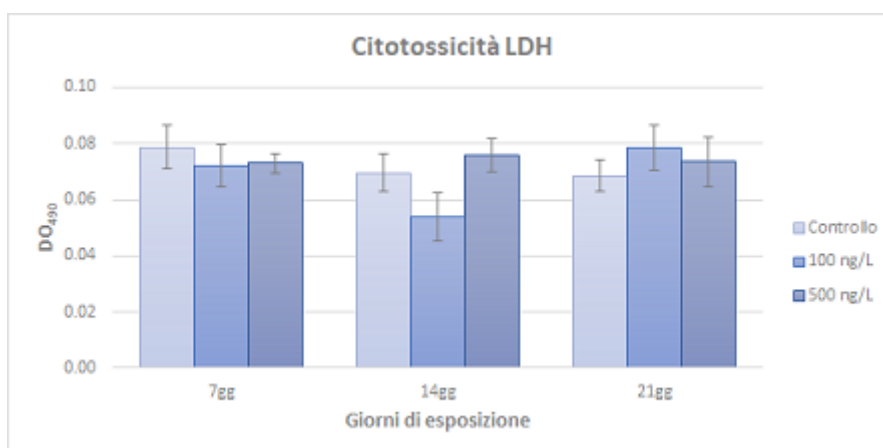
Dal confronto a coppie è emerso che il trattamento con 500 ng/L per 7 gg e 21 gg ha causato un significativo incremento della proliferazione cellulare ( $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , rispettivamente) rispetto ai relativi controlli (Figura 3.4).



**Figura 3.4** - Valori di proliferazione cellulare nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione, espressi in DO<sub>450</sub> sugli emociti totali. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard, n = 6. Gli asterischi indicano differenze significative con il controllo: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

### 3.1.3 LDH

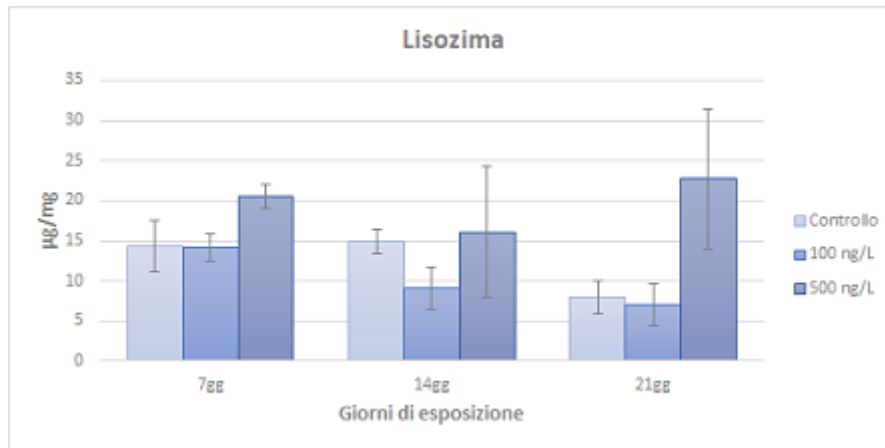
Le variabili considerate (trattamento, tempo di esposizione e loro interazione) non hanno causato alterazioni significative dell'attività dell'LDH (Figura 3.5) (Appendice B).



**Figura 3.5** - Valori di citotossicità nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione, espressi in DO<sub>490</sub>. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard, n = 6.

### 3.1.4 Lisozima

Anche per quanto riguarda l'attività del lisozima, le variabili considerate (trattamento, tempo di esposizione e loro interazione), non hanno causato alterazioni statisticamente significative (Figura 3.6) (Appendice B).



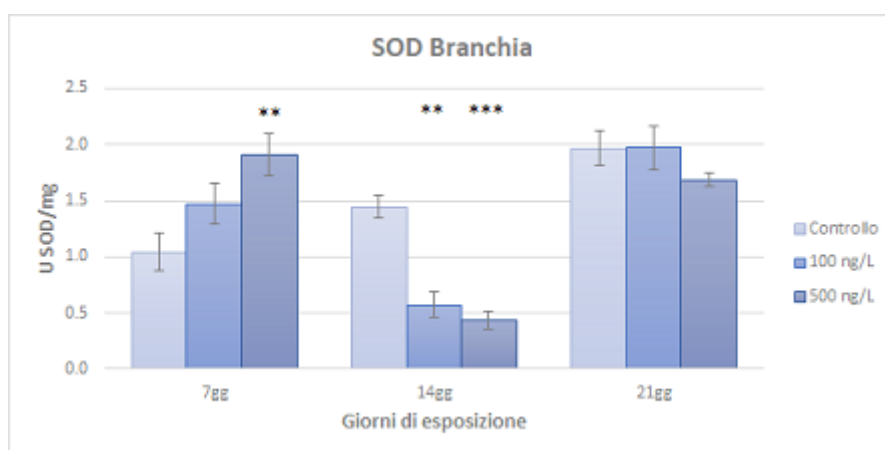
**Figura 3.6** - Valori di lisozima nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione, espressi in µg di lisozima su mg di proteine. I risultati sono espressi come media ± errore standard, n = 6.

## 3.2 Attività degli enzimi antiossidanti

### 3.2.1 SOD

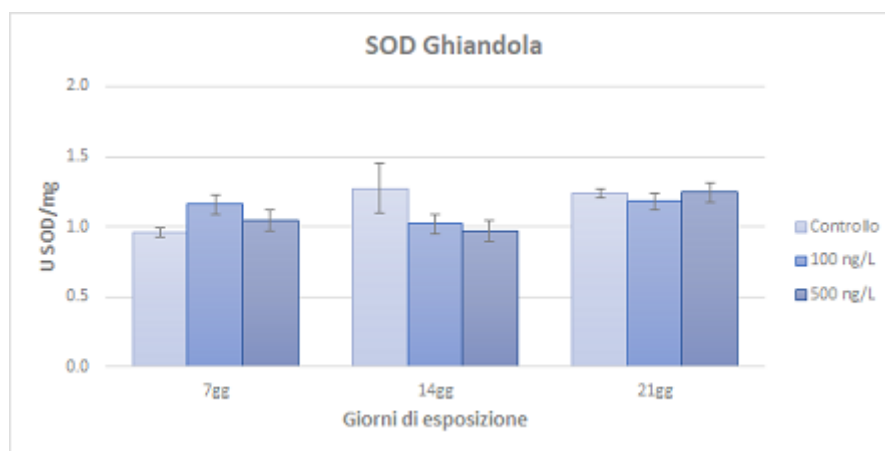
Nella branchia di *R. philippinarum*, è stata osservata una variazione dell'attività della SOD altamente significativa ( $p < 0.001$ ) causata sia dal tempo di esposizione che dall'interazione tempo x trattamento (Appendice B).

Dal confronto a coppie, si può osservare un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) dell'attività enzimatica negli animali esposti a 500 ng/L per 7 gg rispetto al controllo. Inoltre, dopo 14gg di esposizione l'attività enzimatica era diminuita in maniera significativa dopo trattamento con 100 ng/L ( $p < 0.01$ ) e 500 ng/L ( $p < 0.001$ ) rispetto ai relativi controlli (Figura 3.7).



**Figura 3.7** - Valori dell'attività della SOD della branchia nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione, espressi come unità di enzima su mg di proteine. I risultati sono espressi come media ± errore standard, n = 6. Gli asterischi indicano differenze significative con il controllo: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

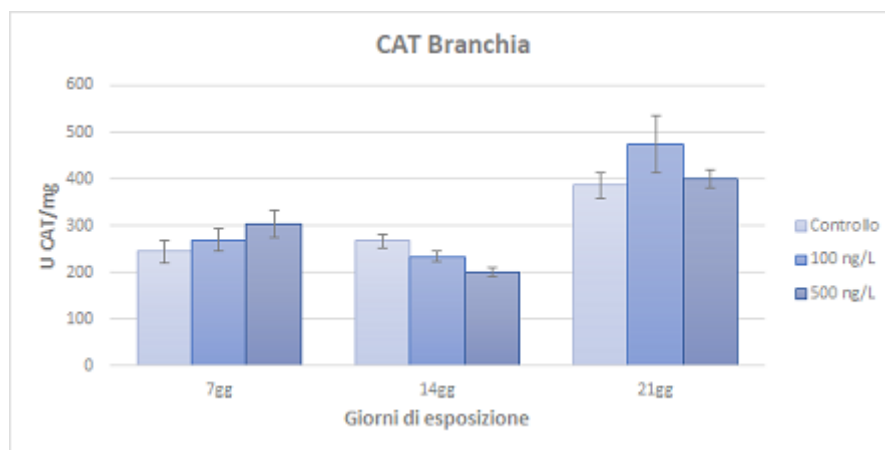
Per quanto riguarda la ghiandola digestiva, invece, è stato osservato solamente un effetto significativo del tempo di esposizione ( $p < 0.05$ ) sull'attività enzimatica (Figura 3.8), non del trattamento o dell'interazione tra tempo x trattamento (Appendice B).



**Figura 3.8** - Valori dell'attività della SOD della ghiandola nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione, espressi come unità di enzima su mg di proteine. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard,  $n = 6$ .

### 3.2.2 CAT

L'attività della CAT nella branchia ha evidenziato una variazione altamente significativa in funzione del tempo di esposizione ( $p < 0.001$ ), ma non del trattamento o dell'interazione tra le due variabili (Figura 3.9) (Appendice B).

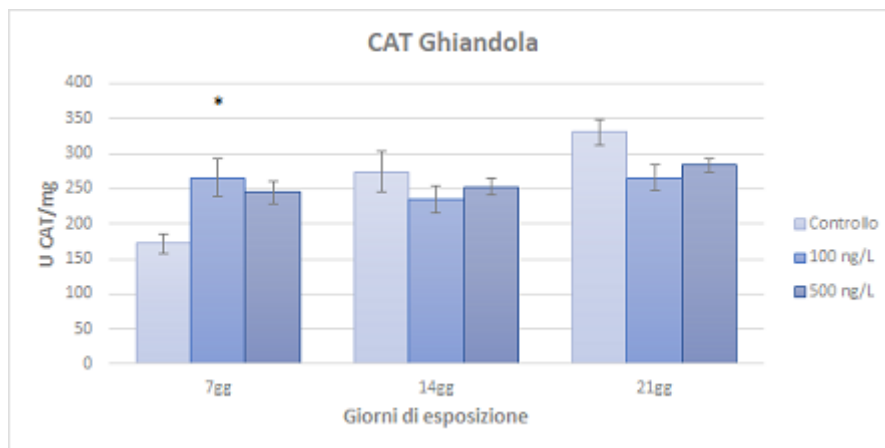


**Figura 3.9** - Valori dell'attività della CAT della branchia, espressi come unità di enzima su mg di proteine nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard,  $n = 6$ .

Invece, nella ghiandola digestiva è stato evidenziato un effetto significativo del tempo di esposizione ( $p < 0.001$ ), e dell'interazione tempo x trattamento ( $p < 0.01$ ) (Appendice B). Dal confronto a coppie, risulta che i molluschi esposti a 100 ng/L per 7 gg hanno avuto un



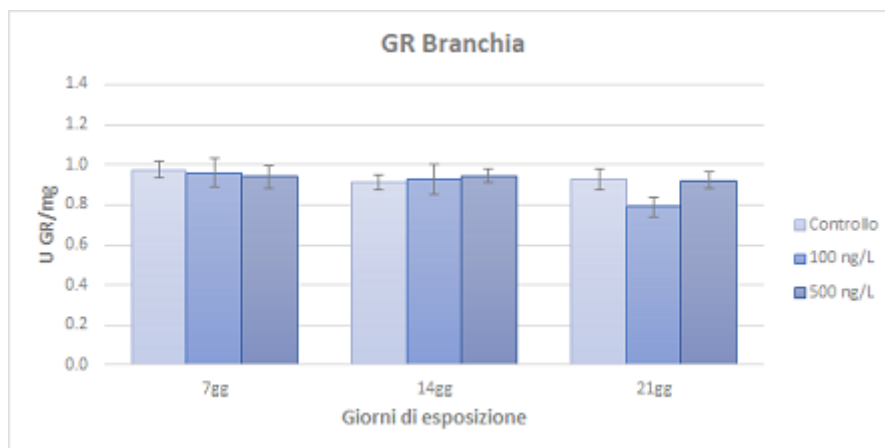
significativo incremento ( $p < 0.05$ ) dell'attività enzimatica rispetto al relativo controllo (Figura 3.10).



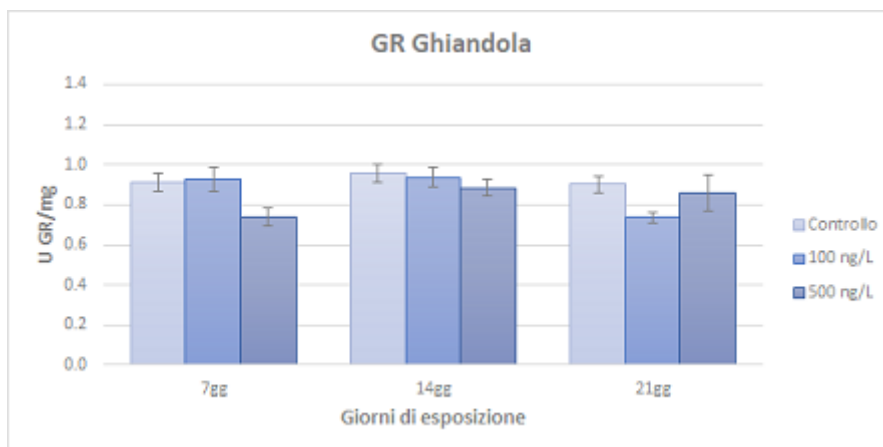
**Figura 3.10** - Valori dell'attività della CAT, espressi come unità di enzima su mg di proteine, nella ghiandola digestiva nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard,  $n = 6$ . Gli asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo: \* $p < 0.05$ .

### 3.2.3 GR

Dall'analisi dei risultati, l'attività della GR non ha evidenziato alcuna variazione statisticamente significativa, sia nella branchia che nella ghiandola di *R. philippinarum*. (Figure 3.11 e 3.12) (Appendice B).



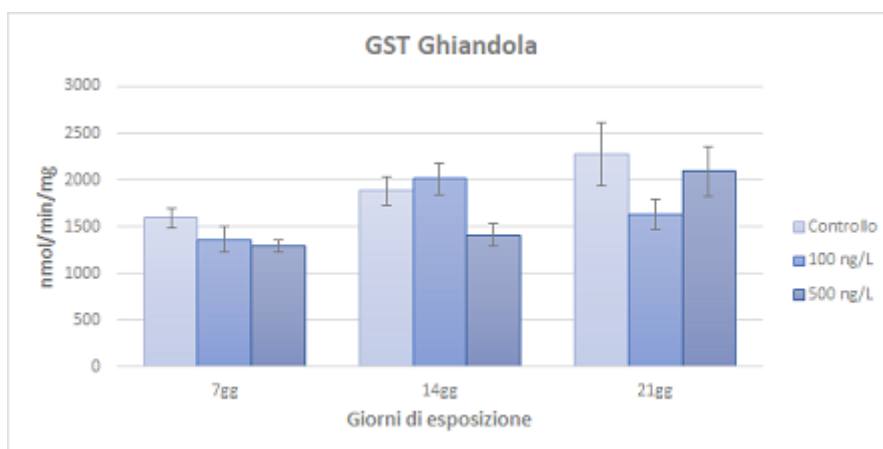
**Figura 3.11** - Valori dell'attività della GR della branchia, espressi come unità di enzima su mg di proteine nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard,  $n = 6$ .



**Figura 3.12** - Valori dell'attività della GR nella ghiandola digestiva, espressi come unità di enzima su mg di proteine nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard, n = 6.

### 3.2.4 GST

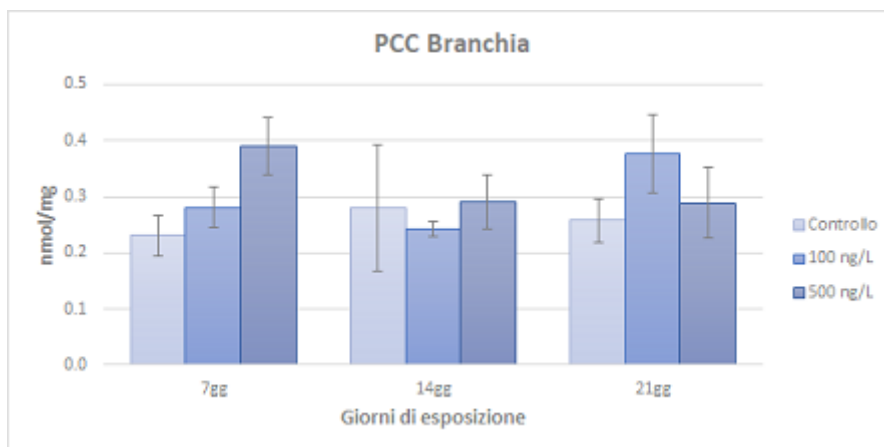
L'attività della GST nella ghiandola digestiva degli animali ha evidenziato una variazione significativa causata solo dal tempo di esposizione ( $p < 0.01$ ) (Figura 3.13) (Appendice B).



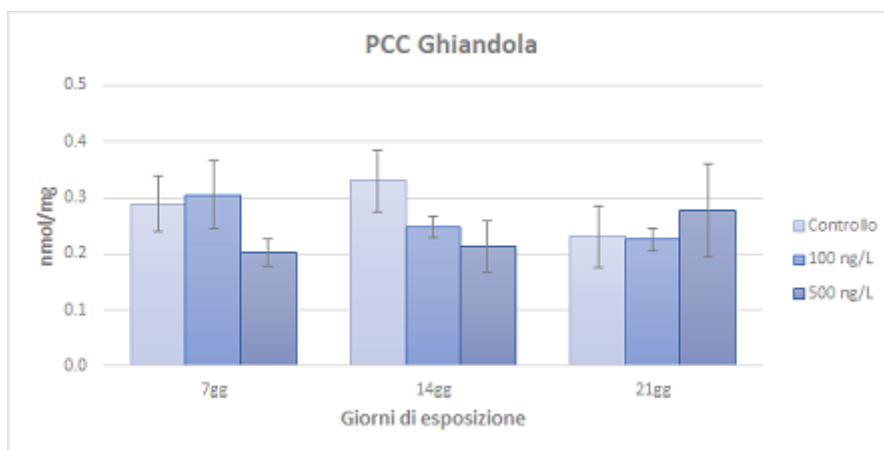
**Figura 3.13** - Valori dell'attività della GST della ghiandola digestiva, espressi come nmol/min/mg di proteine, nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard, n = 6.

### 3.3 PCC

Sia nella branchia che nella ghiandola digestiva non sono state evidenziate variazioni significative causate dalle variabili sperimentali (Figure 3.14 e 3.15) (Appendice B).



**Figura 3.14** - Valori di PCC della branchia nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione, espressi in nmol di gruppi carbonilici su mg di proteine. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard, n = 6.

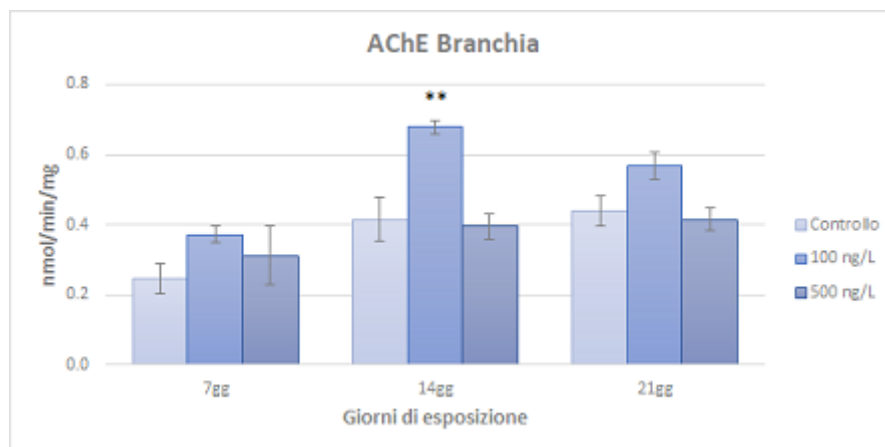


**Figura 3.15** - Valori di PCC della ghiandola nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione, espressi in nmol di gruppi carbonilici su mg di proteine. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard, n = 6.

### 3.4 AChE

Per quanto riguarda l'attività dell'AChE, è stata evidenziata una variazione significativa sia per effetto del tempo di esposizione ( $p < 0.001$ ) sia per effetto del trattamento ( $p < 0.001$ ) (Appendice B).

In particolare, dal confronto a coppie è emerso che l'attività dell'AChE è aumentata significativamente ( $p < 0.01$ ) negli animali esposti a 100 ng/L per 14 gg rispetto al controllo (Figura 3.16).



**Figura 3.16** - Valori dell'attività dell'AChE della branchia, espressi come nmol/min/mg di proteine, nei diversi trattamenti a 7, 14 e 21 giorni di esposizione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard, n = 6. Gli asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo: \*\*p < 0.01.

### 3.5 Concentrazioni di galaxolide nell'acqua di mare

In Tabella 3.1 sono riportati i risultati dell'analisi del galaxolide al GC-MS degli estratti di acqua di mare.

**Tabella 3.1** - Risultati delle concentrazioni trovate nei campioni estratti di acqua di mare (2 repliche per tre campionamenti a 7, 14 e 21 gg). LLOQ: lower limit of quantification; LOD: limit of detection.

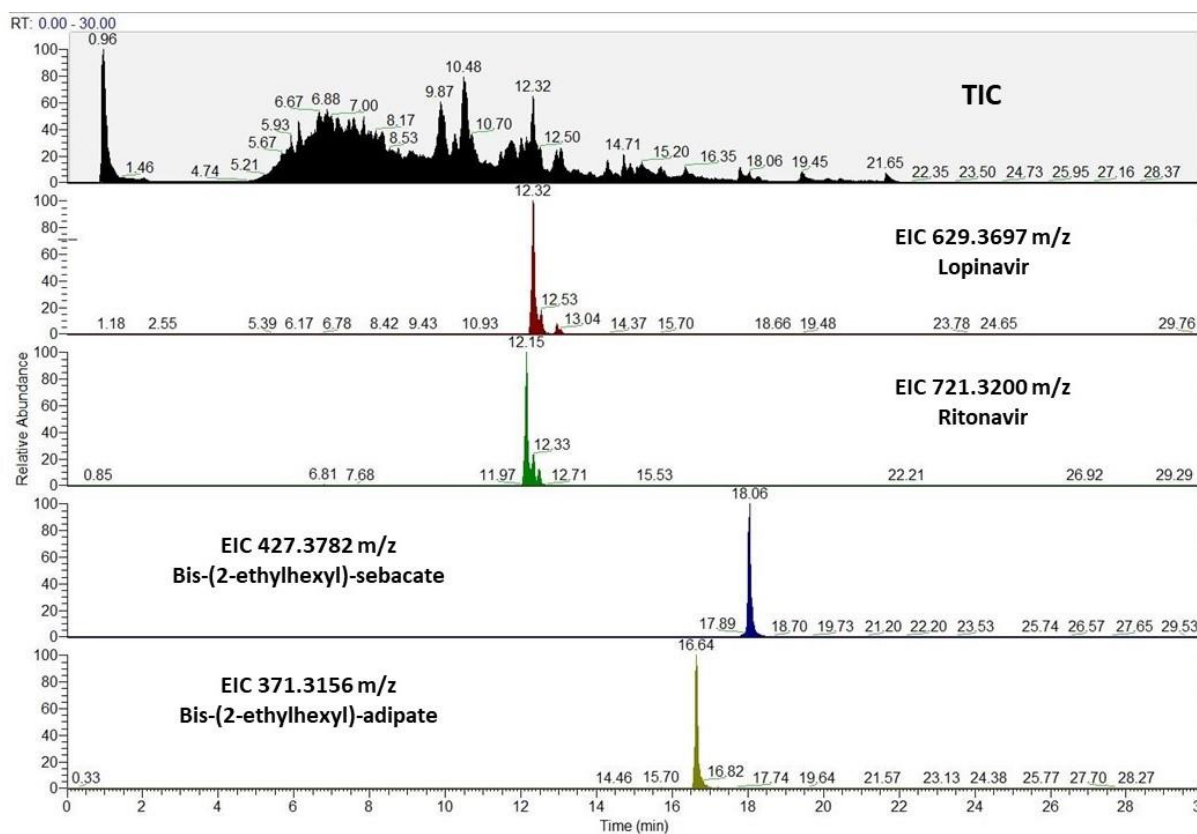
| repliche | 7 gg   | 14 gg | 21 gg |
|----------|--------|-------|-------|
| C1       | < LLOQ | < LOD | < LOD |
| C2       | < LLOQ | < LOD | < LOD |

Dati i valori al di sotto del LOD e del LLOQ, non si può quantificare la presenza di galaxolide nei campioni analizzati.

### 3.6 Analisi *untarget* dei contaminanti nelle vongole

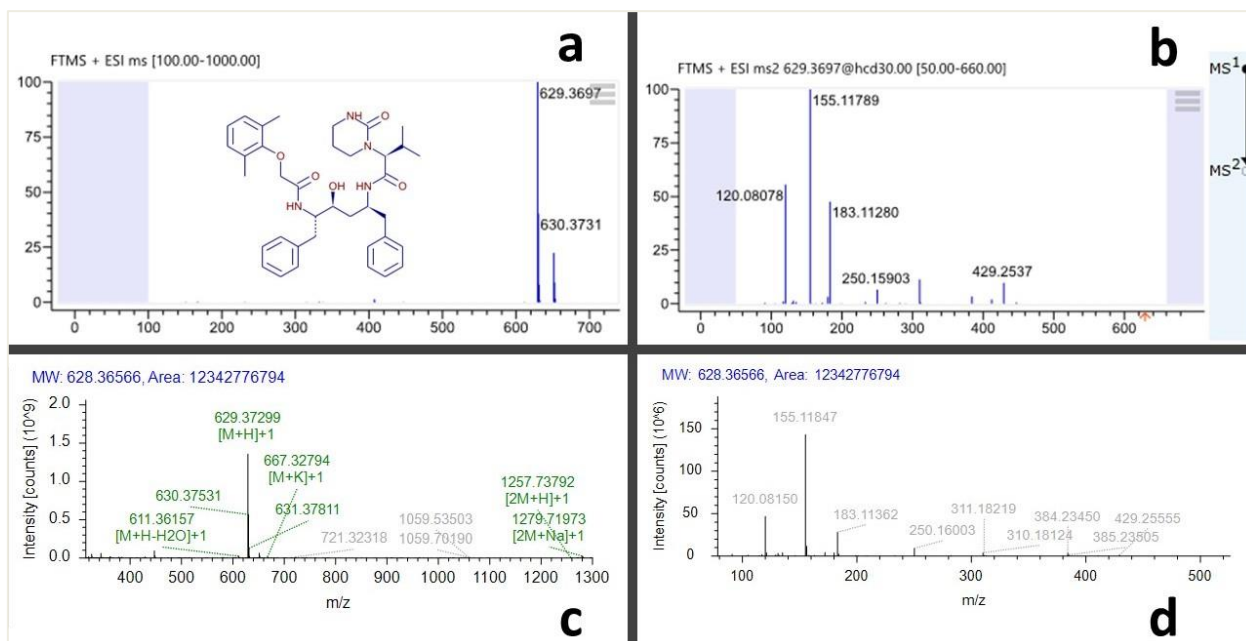
Gli spettri MS e MS/MS ottenuti dall'analisi in HPLC-HRMS sono stati processati con il software Compound Discoverer 3.2 alla ricerca di *match* nelle librerie, con confronto di 25008 composti per la ionizzazione in positivo e di 2695 per la ionizzazione in negativo. L'acquisizione in negativo non ha dato nessun risultato che soddisfacesse i criteri di selettività scelti. L'acquisizione in positivo, invece, ha dato circa una cinquantina di risultati. Nella maggior parte, i composti rilevati sono acidi grassi, naturalmente presenti nei tessuti lipidici delle vongole, o metaboliti. Tuttavia, sono stati rilevati anche alcuni composti di origine sintetica non normalmente presenti in ambiente. Nello specifico, sono stati rilevati due composti farmaceutici antivirali, il Lopinavir e il Ritonavir, in tutti e tre i campioni. In

aggiunta, sono stati trovati anche due diestri sintetici, il di-(2-etilesil)-sebacato (DEHS) e il di-(2-etilesil)-adipato (DEHA). Il galaxolide invece non è stato rilevato in nessuno dei tre *pool* di vongole. In Figura 3.17 sono riportati i cromatogrammi del campione Pool1, sia della TIC (*Total ion current*) che degli EIC (*Extracted ion chromatogram*) dei diversi composti trovati positivi al *match* con il programma Compound Discoverer 3.2 (i cromatogrammi dei campioni Pool2 e Pool3 sono riportati in Appendice C).

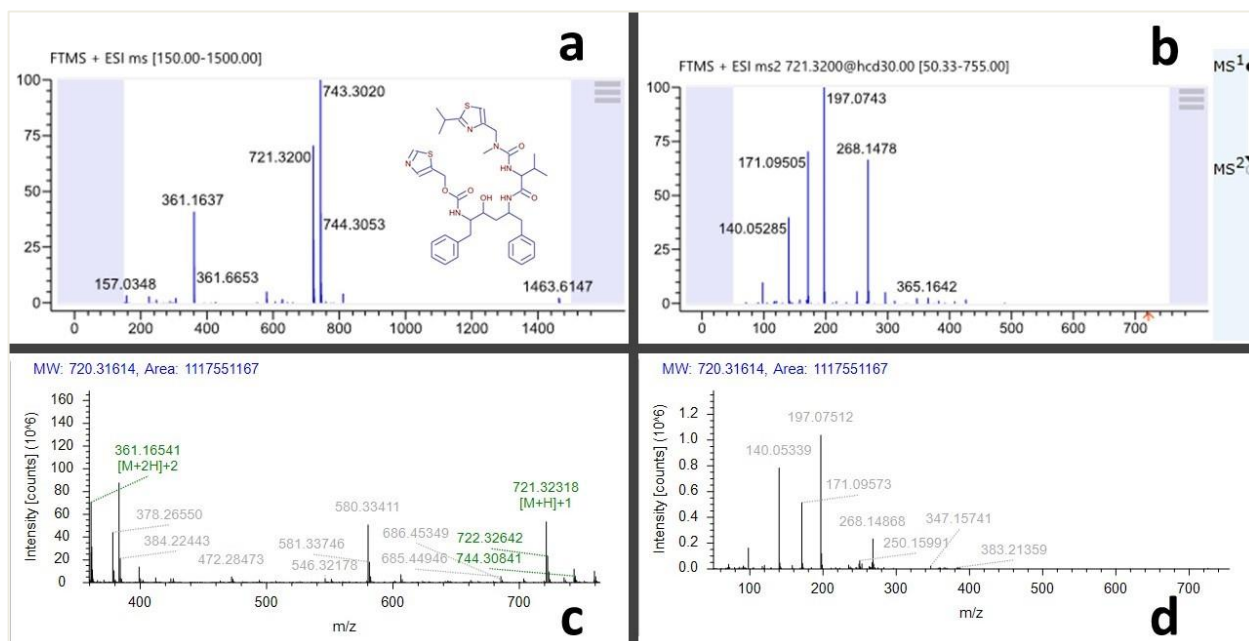


**Figura 3.17** - Cromatogramma TIC (in alto) ed EIC degli  $m/z$  degli ioni molecolari  $[M-H]^+$  per i diversi composti considerati (Lopinavir, Ritonavir, di-(2-etilesil)-sebacato e di-(2-etilesil)-adipato) del campione Pool1. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo dell'analisi, mentre sulle ordinate l'abbondanza relativa.

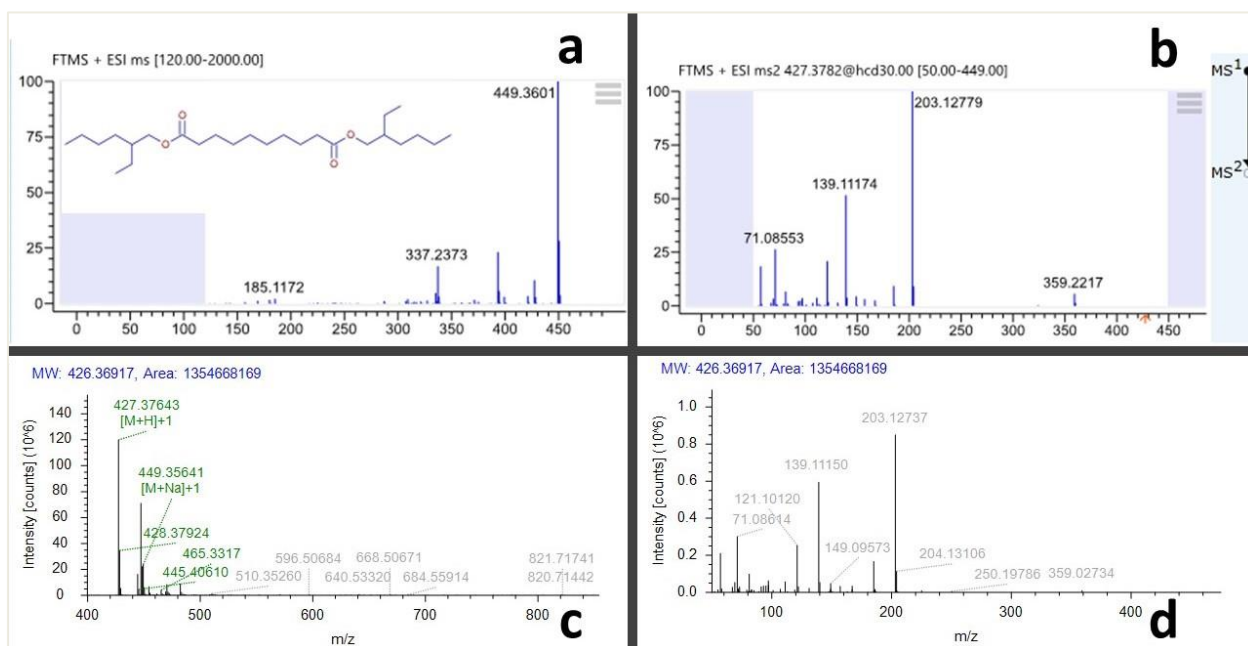
In Figura 3.18, 3.19, 3.20 e 3.21 sono riportati gli spettri di massa in FS e in ddMS<sup>2</sup> dei quattro composti trovati.



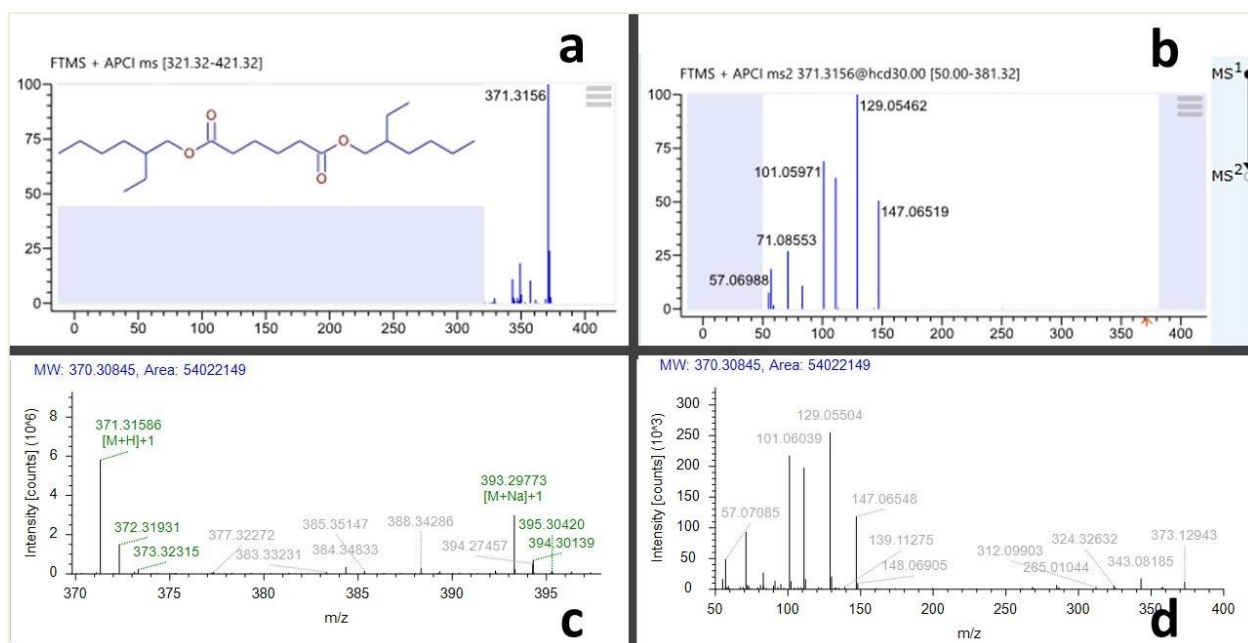
**Figura 3.18** - Confronto degli spettri MS e MS/MS di Lopinavir tra il database mzCloud (sopra) e il campione Pool1 (sotto). In ordine: (a) struttura molecolare del Lopinavir e suo spettro MS secondo mzCloud; (b) spettro MS/MS a 30 eV secondo mzCloud; (c) spettro MS ottenuto per il campione Pool1; (d) spettro MS/MS ottenuto per il campione Pool1 a 35 eV.



**Figura 3.19** - Confronto degli spettri MS e MS/MS di Ritonavir tra il database mzCloud (sopra) e il campione Pool1 (sotto). In ordine: (a) struttura molecolare del Ritonavir e suo spettro MS secondo mzCloud; (b) spettro MS/MS a 30 eV secondo mzCloud; (c) spettro MS ottenuto per il campione Pool1; (d) spettro MS/MS ottenuto per il campione Pool1 a 35 eV.

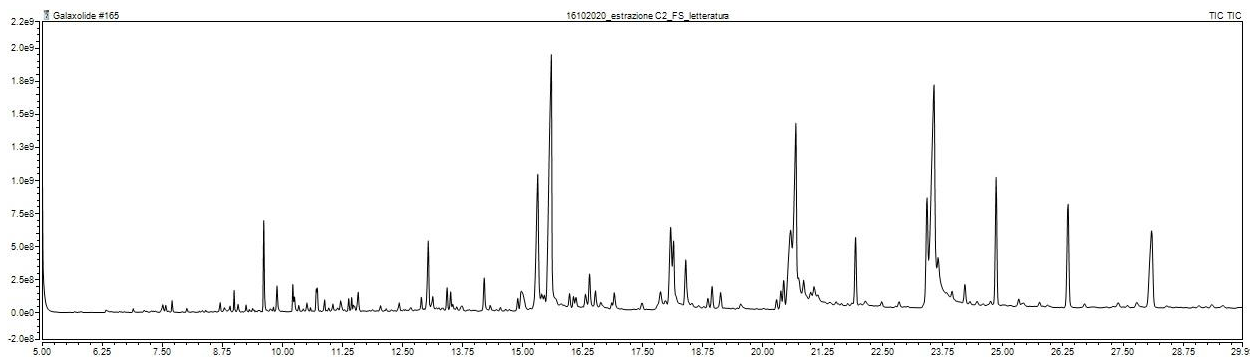


**Figura 3.20** - Confronto degli spettri MS e MS/MS del di-(2-etilesil)-sebacato (DEHS) tra il database mzCloud (sopra) e il campione Pool1 (sotto). In ordine: (a) struttura molecolare del DEHS e suo spettro MS secondo mzCloud; (b) spettro MS/MS a 30 eV secondo mzCloud; (c) spettro MS ottenuto per il campione Pool1; (d) spettro MS/MS ottenuto per il campione Pool1 a 35 eV.

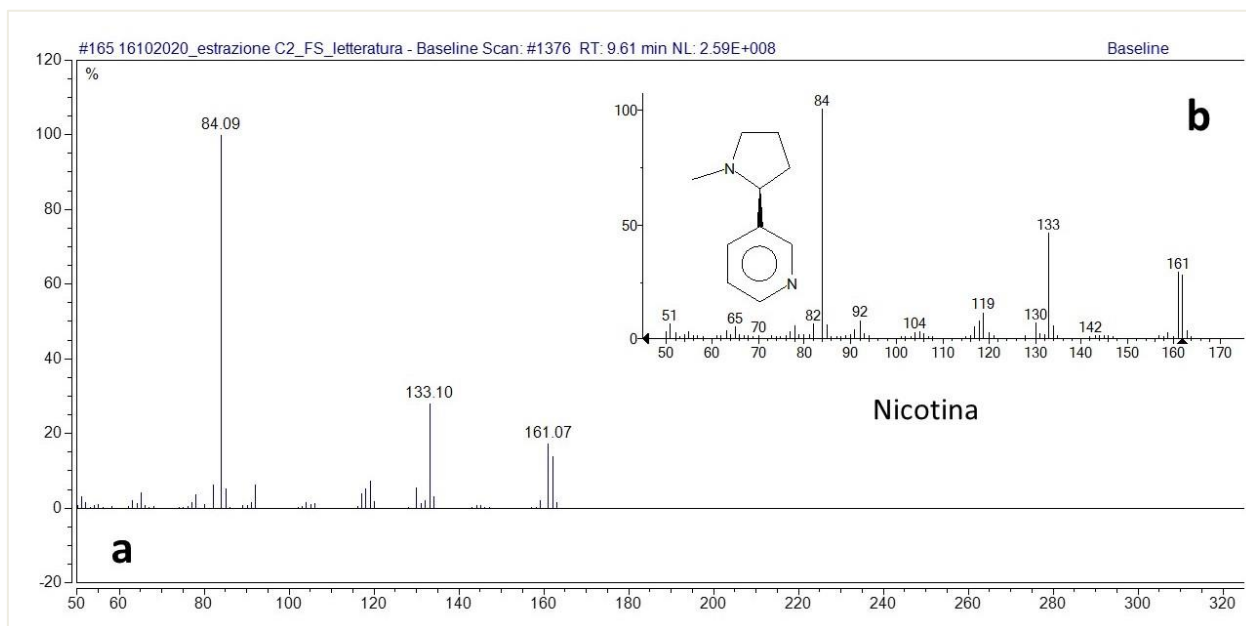


**Figura 3.21** - Confronto degli spettri MS e MS/MS del di-(2-etilesil)-adipato (DEHA) tra il database mzCloud (sopra) e il campione Pool1 (sotto). In ordine: (a) struttura molecolare del DEHA e suo spettro MS secondo mzCloud; (b) spettro MS/MS a 30 eV secondo mzCloud; (c) spettro MS ottenuto per il campione Pool1; (d) spettro MS/MS ottenuto per il campione Pool1 a 35 eV.

L'analisi *screening* al GC-MS in FS ha rilevato diversi composti, molti dei quali acidi grassi comuni dei tessuti lipidici (Figura 3.22). Tuttavia, da ricerca e confronto manuale con libreria NIST sono stati trovati due composti non presenti normalmente in natura: la nicotina (*match* del 79.5%) (Figura 3.23) e il Cinerin II (*match* del 74.1%) (Figura 3.24).

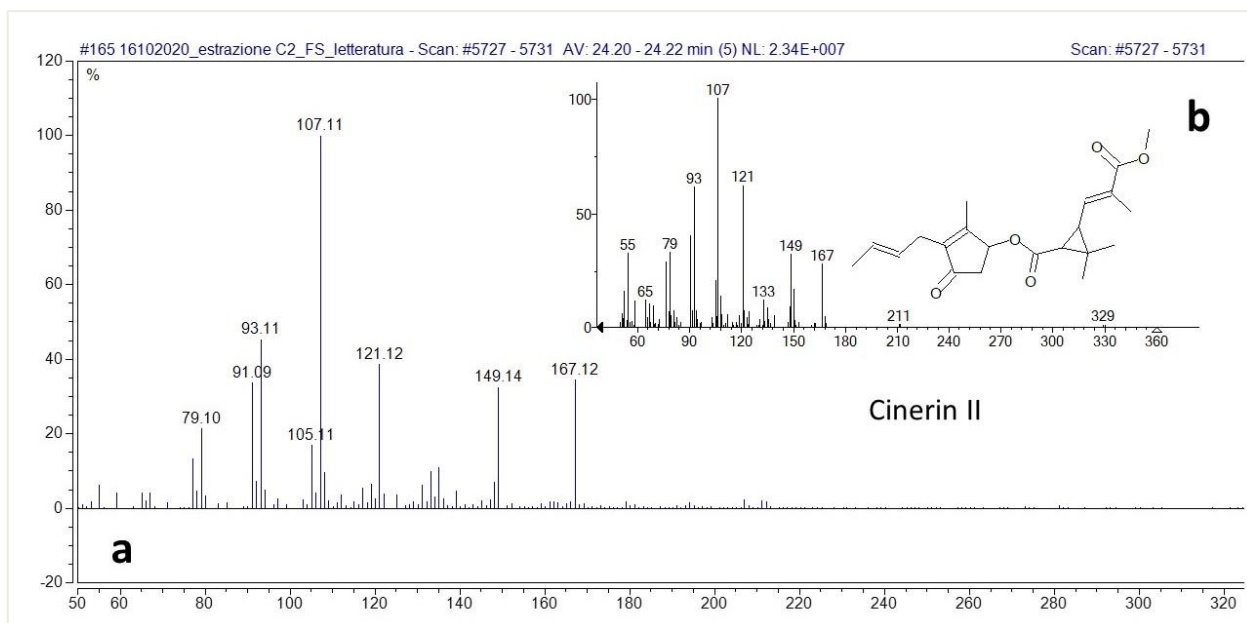


**Figura 3.22** - Cromatogramma FS dell'analisi in GC-MS del campione Pool1.



**Figura 3.23** - (a) spettro MS della nicotina trovata nel campione Pool1; (b) struttura molecolare della nicotina e spettro MS di riferimento del database NIST.

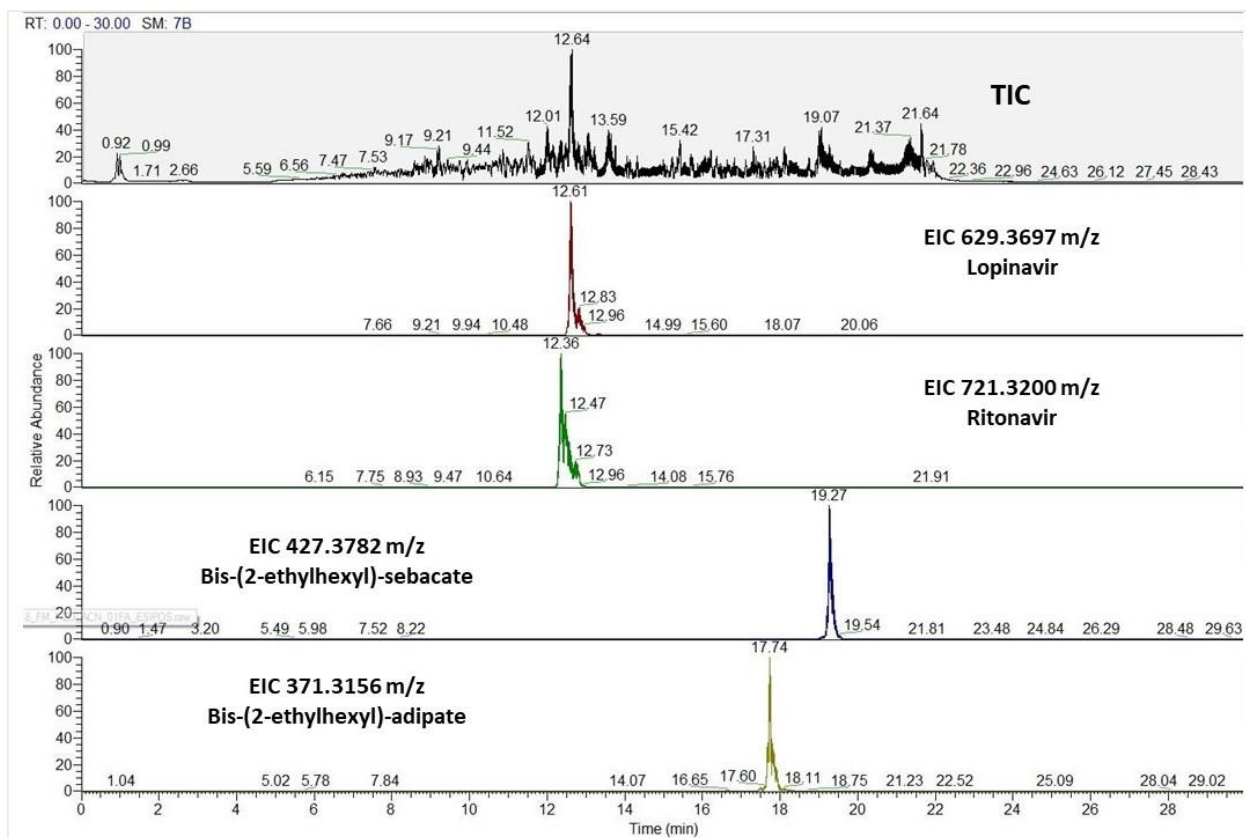




**Figura 3.24** - (a) spettro MS del Cinerin II trovato nel campione Pool1; (b) struttura molecolare del Cinerin II e spettro MS di riferimento del database NIST.

### 3.7 Analisi *untarget* dei contaminanti nell'acqua di mare

Anche per l'acqua di mare gli spettri di massa ottenuti in HPLC-HRMS sono stati processati con il software Compound Discoverer 3.2, ed è stato eseguito il confronto di 25008 composti per la ionizzazione in positivo e di 2695 per la ionizzazione in negativo. L'analisi *screening* con metodo di acquisizione in FS-ddMS<sup>2</sup> in negativo non ha dato risultati significativi. L'acquisizione in positivo, invece, ha confermato la presenza dei quattro contaminanti trovati nelle vongole (Lopinavir, Ritonavir, DEHS e DEHA) anche nell'acqua di mare analizzata (Figura 3.24) (il cromatogramma del campione W2 è riportato in Appendice C). In aggiunta, il confronto degli spettri MS e MS/MS con i diversi database utilizzati dal programma Compound Discoverer 3.2 hanno mostrato la presenza di altri quattro contaminanti di origine sintetica. Nello specifico, si è visto un *match* positivo per diisodecil-ftalato, N-Isopropil-N'-fenil-p-fenilendiammina, Alverina e N,N'-dicicloesilurea (Appendice C).



**Figura 3.25** - Cromatogramma TIC (in alto) ed EIC degli  $m/z$  degli ioni molecolari  $[M-H]^+$  per i diversi composti considerati (Lopinavir, Ritonavir, di-(2-ethylhexyl)-sebacate e di-(2-ethylhexyl)-adipato) del campione W1. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo dell'analisi, mentre sulle ordinate l'abbondanza relativa.

## 4. DISCUSSIONE

Il galaxolide è una fragranza appartenente alla famiglia dei muschi sintetici, largamente utilizzata nei prodotti per la pulizia e per l'igiene personale (Vallecillos et al., 2015). Il suo largo uso in ambiente domestico, unitamente a trattamenti delle acque reflue spesso non efficaci, ne determina un continuo rilascio negli ecosistemi acquatici, specialmente quelli fluviali (Vallecillos et al., 2015; Villa et al., 2012). Questo comporta una continua esposizione degli organismi a questa sostanza (Daughton & Ternes, 1999).

Dal momento che il galaxolide è ritenuto un contaminante emergente come molti PPCPs (*Pharmaceutical and Personal Care Products*), è stato oggetto di alcuni studi tossicologici, specialmente con organismi acquatici (Tumová et al., 2019). Tuttavia, solo un lavoro oltre al presente è stato eseguito su *R. philippinarum* e le informazioni sulla tossicità cronica di tale inquinante sugli altri organismi marini sono ad oggi molto scarse (Ehiguese et al., 2020).

Questo lavoro di tesi ha avuto come scopo principale determinare se il galaxolide potesse arrecare danni di tipo ossidativo, neurotossico o immunotossico, su un organismo marino filtratore quale *R. philippinarum*. Sono stati quindi valutati gli effetti di due concentrazioni di galaxolide, ovvero 100 ng/L e 500 ng/L, già testate in altri lavori (Parolini et al., 2015); queste concentrazioni sono simili a quelle comunemente trovate nelle acque superficiali in Italia e in Europa (Parolini et al., 2015).

Si è voluto inoltre verificare la presenza di galaxolide all'interno dell'acqua di mare raccolta nella laguna di Venezia presso Chioggia. In aggiunta, si è condotta un'analisi *untarget* dei contaminanti presenti all'interno della stessa acqua e delle vongole esposte a quest'ultima.

### 4.1 Effetti sugli emociti

Il sistema immunitario dei molluschi si basa largamente sull'azione difensiva degli emociti, liberamente circolanti nell'emolinfa (Matozzo & Gagné, 2016). Una delle funzioni principali di queste cellule è la fagocitosi, ossia l'internalizzazione di corpi *non-self* all'interno dei fagosomi, dove gli enzimi litici operano la lisi del materiale estraneo. In questo processo vengono prodotte delle specie con funzione battericida, tra le quali le ROS e le RSN (Galloway & Depledge, 2001). Fattori come intense variazioni ambientali o esposizione a contaminanti possono causare effetti negativi sulle difese immunitarie, che possono potenzialmente portare a maggiore sensibilità degli animali agli agenti patogeni (Galloway & Depledge, 2001). È stato dimostrato come contaminanti quali metalli pesanti (Kaloyianni et al., 2009),

composti organostannici (Matozzo et al., 2002) e composti organici tipo PAHs e lindano (Kaloyianni et al., 2009), possano dare un effetto immunotossico nei molluschi. Per cui, indagare le variazioni dei parametri emocitari può consentire una valutazione dello stato di immunomodulazione negli organismi. A tal fine, nel presente studio sono stati analizzati diversi *immunomarkers*, ovvero THC, diametro e volume degli emociti, proliferazione cellulare, citotossicità e attività del lisozima degli emociti. All'attuale stato dell'arte, non risultano presenti in letteratura dati sugli effetti del galaxolide sul sistema immunitario di organismi marini.

Il THC è molto utilizzato come indicatore degli effetti cellulari di contaminanti ambientali nei molluschi. È stato visto come un aumento del numero di emociti può essere causato dall'aumentata proliferazione cellulare o dalla migrazione delle cellule dai tessuti periferici dell'organismo all'emolinfa (Pipe & Coles, 1995). Al contrario, una riduzione del THC può essere dovuta alla migrazione degli emociti dall'emolinfa ad altri tessuti per andare a contrastare una possibile minaccia, oppure in conseguenza di morte cellulare (Pipe & Coles, 1995). L'esposizione al galaxolide ha causato una riduzione significativa del THC di *R. philippinarum*, in particolare dopo 21 giorni di esposizione a 500 ng/L. Altri studi sui PPCPs hanno dimostrato la riduzione del THC nella vongola a seguito dell'esposizione a queste sostanze. Ad esempio, è stata osservata nell'emolinfa di *R. philippinarum* dopo esposizione all'antinfiammatorio ibuprofene (Matozzo et al., 2012d) e al triclosan, un antibatterico per l'igiene orale di largo uso (Matozzo et al., 2012b). Nel caso del presente studio, si ipotizza che questa diminuzione possa essere dovuta alla migrazione degli emociti dall'emolinfa verso altri tessuti della vongola. Tuttavia, l'aumentata proliferazione cellulare osservata negli stessi campioni non sembra aver indotto un aumento del THC. Probabilmente, la diminuzione dei valori di THC osservata alla concentrazione più alta di galaxolide è stata tale che l'aumentata proliferazione cellulare ha solo parzialmente colmato la ridotta presenza di cellule nell'emolinfa.

Riguardo alle dimensioni degli emociti, non si sono osservate differenze rilevanti. Normalmente, un aumento del diametro e del volume degli emociti potrebbe essere dato dall'attività di fagocitosi, che può portare all'inclusione di materiale estraneo all'interno della cellula e quindi ad un aumento delle sue dimensioni. Invece, una riduzione delle dimensioni può essere data dalla fuoriuscita di fluidi del citoplasma dovuta a danni nella membrana cellulare (Matozzo et al., 2012b). Difatti, alcuni contaminanti possono dare modificazioni del citoscheletro, ad esempio causando un danno ossidativo alle proteine di membrana

(Matozzo et al., 2012b). È questo il caso di uno studio dove l'esposizione di *R. philippinarum* ad una concentrazione di 900 ng/L di triclosan ha dato una significativa riduzione del diametro e del volume degli emociti (Matozzo et al., 2012b).

Un parametro che ha evidenziato una variazione molto significativa per effetto del trattamento è stata la proliferazione cellulare, misurata mediante il saggio XTT. In *R. philippinarum* è stato osservato che gli emociti sono in grado di dividersi nell'emolinfa (Matozzo et al., 2008). Nel presente studio è stato osservato che a 21 gg di esposizione, il trattamento con galaxolide a 500 ng/L ha provocato un sostanziale incremento della proliferazione cellulare rispetto al controllo, a fronte invece di una significativa diminuzione del THC. Anche a 7 gg la proliferazione cellulare dei trattati con 500 ng/L ha fatto registrare un valore significativamente più alto del controllo. Osservando nel complesso l'andamento dei due parametri per la concentrazione testata di 500 ng/L, si può notare la tendenza a 7 e 21 gg di esposizione ad una riduzione del valore di THC e ad un rispettivo aumento della proliferazione cellulare. Per la concentrazione più elevata testata, sembra che l'aumento della proliferazione cellulare dopo 7 gg di esposizione sia servita per bilanciare la riduzione del THC, mentre questa possibilità è venuta meno a 21 gg. Quanto ipotizzato pocanzi è stato osservato anche in uno studio di esposizione di *R. philippinarum* ad ibuprofene, dove una concentrazione di 1000 µg/L ha causato la diminuzione del THC ed un aumento della proliferazione degli emociti (Matozzo et al., 2012d). Al contrario, in un altro lavoro sulla stessa specie esposta a triclosan è stata osservata una riduzione del valore di THC e una concomitante diminuzione della proliferazione cellulare (Matozzo et al., 2012b). Comunque, è da sottolineare che la proliferazione degli emociti è un parametro cellulare che può variare in maniera considerevole nei molluschi, a seguito di diversi fattori di stress (Matozzo et al., 2012b).

La determinazione dell'attività dell'LDH è uno strumento utile in ecotossicologia per verificare l'eventuale citotossicità di un inquinante. La lattato deidrogenasi (LDH) è infatti un enzima lisosomiale presente all'interno del citoplasma. L'eventuale attività di questo enzima nell'emolinfa priva di emociti sta a significare il rilascio dell'enzima a causa di danni alla membrana cellulare o di lisi delle cellule (Matozzo et al., 2012b). Dai risultati ottenuti, non sembra vi siano effetti citotossici del galaxolide a carico degli emociti di *R. philippinarum*. Ciò permette di escludere la morte cellulare come causa della diminuzione del THC vista in precedenza. Da confronto con i dati di letteratura, si osserva invece che nel caso del triclosan vi è stato un danno citotossico negli emociti di *R. philippinarum* a tutte le concentrazioni

testate (300 ng/L, 600 ng/L e 900 ng/L) (Matozzo et al., 2012b). Allo stesso modo, l'esposizione delle vongole a 1000 µg/L di ibuprofene ha dato evidenze di citotossicità (Matozzo et al., 2012d).

Il lisozima è una idrolasi acida contenuta nei lisosomi degli emociti, e svolge un'importante funzione litica contro batteri e patogeni. È il principale agente batteriolitico nei fagosomi, in grado di digerire diversi batteri sia Gram positivi che Gram negativi (Monari et al., 2007). Sebbene sia sintetizzato negli emociti, può all'occorrenza essere rilasciato all'interno dell'emolinfa durante la fagocitosi per favorire la degradazione dei patogeni (Monari et al., 2007). Una riduzione dell'attività del lisozima può comportare una ridotta immunosorveglianza (Matozzo et al., 2012b). Nei lavori presenti in letteratura, l'attività del lisozima è stata determinata sia nell'emolinfa priva di emociti che nel lisato degli stessi. È stato visto che in *R. philippinarum* l'attività del lisozima è maggiore negli emociti piuttosto che nell'emolinfa (Matozzo et al., 2003). Per questo motivo, in questo lavoro come in altri (Matozzo et al., 2012b) si è scelto di valutare il lisozima solamente nel lisato cellulare. I risultati dell'esposizione a galaxolide hanno dato una risposta significativa per quanto concerne l'effetto del trattamento sugli animali. L'esposizione a 500 ng/L ha indotto una maggior attività del lisozima specialmente dopo 21 gg, che potrebbe suggerire la stimolazione della risposta immunitaria a quella concentrazione. Tuttavia, dal test post-hoc HSD di Tukey non risulta nessuna variazione statisticamente significativa nel confronto tra controllo e trattati. In un lavoro precedente, Matozzo et al. (2012b) hanno valutato la variazione dell'attività del lisozima in seguito a esposizione di *R. philippinarum* a triclosan; anche in quello studio non sono stati osservati effetti significativi (Matozzo et al., 2012b). L'esposizione delle vongole a 100 µg/L e 1000 µg/L di ibuprofene, al contrario, ha determinato una significativa riduzione dell'attività del lisozima nell'emolinfa priva di emociti, suggerendo un'immunosoppressione dovuta dal contaminante (Milan et al., 2013).

#### **4.2 Stress ossidativo**

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono molecole con forte potere ossidante che possono causare danni alle strutture cellulari (Livingstone, 2001). L'esposizione a diversi tipi di contaminanti può causare una maggior produzione di queste specie nei tessuti dell'organismo, superando le capacità antiossidanti della cellula e dando quindi un effetto ossidativo (Valavanidis et al., 2006). In ecotossicologia, l'analisi dell'attività degli enzimi antiossidanti può essere un indice di eventuale stress ossidativo. È doveroso tenere presente, comunque, che l'attività degli enzimi antiossidanti nei molluschi è molto

suscettibile a fattori biologici come età e periodo riproduttivo, ma anche a fattori ambientali tipo il pH, la temperatura e l'ossigeno disciolto (Livingstone, 2001). Per determinare se il galaxolide abbia un effetto ossidativo su *R. philippinarum*, in questo lavoro è stata misurata l'attività di enzimi antiossidanti quali SOD, CAT, GR e GST. Inoltre, sono stati valutati i danni indotti dalle ROS sulle proteine attraverso la quantificazione dei gruppi carbonilici nelle catene laterali (saggio PCC). I tessuti prescelti per questi saggi sono stati le branchie, poiché sono i primi organi che vengono a contatto con i contaminanti presenti in acqua, e la ghiandola digestiva, poiché è la sede dei processi di detossificazione dell'organismo.

#### 4.2.1 Attività degli enzimi antiossidanti

La superossido dismutasi (SOD) è un metalloenzima antiossidante deputato alla dismutazione del radicale superossido, una specie ROS molto reattiva, ad ossigeno e perossido di idrogeno (Crapo et al., 1978). La SOD, lavorando in sinergia con la CAT, rappresenta una delle principali difese antiossidanti della cellula e la sua variazione può dare indicazioni sullo stress ossidativo indotto da contaminanti. La CAT trasforma ulteriormente il perossido di idrogeno (altro ROS) prodotto dalla reazione catalizzata dalla SOD in acqua e ossigeno (Aebi, 1984). L'attività della SOD in questo lavoro è stata determinata sia nella branchia che nella ghiandola digestiva degli animali. Sebbene nella ghiandola sia stato osservato un cambiamento solamente per effetto del tempo di esposizione, nella branchia si sono osservate variazioni ben più significative. Infatti, il trattamento con 500 ng/L per 7 gg ha causato un aumento significativo dell'attività dell'enzima rispetto al controllo. Un andamento opposto invece è stato osservato a 14 gg di esposizione, dove entrambe le concentrazioni di 100 ng/L e di 500 ng/L hanno indotto una forte riduzione dell'attività rispetto al controllo. Questi risultati suggeriscono che nella prima settimana di esposizione il galaxolide ha indotto un'attivazione della SOD forse per contrastare un aumento di ROS nel tessuto, almeno per la concentrazione più alta testata. Dopo la seconda settimana di esposizione, l'attività dell'enzima è drasticamente diminuita rispetto al controllo, il che fa supporre una riduzione delle difese antiossidanti. Dopo 21 gg di esposizione, l'attività è tornata ai valori del controllo. La tendenza ad un ritorno a valori simili a quelli del controllo dopo una iniziale variazione dell'attività dell'enzima è stata osservata anche in altri lavori (Zhang et al., 2012; Chen et al., 2012). Questo andamento non lineare nell'attività della SOD non è tuttavia confermato dai risultati dell'attività nella CAT, in qualità di sua complementare per le ragioni viste in precedenza. Infatti, nella branchia di *R. philippinarum* risulta significativo solo l'effetto del tempo di esposizione al contaminante. Dai risultati del

saggio della SOD, ci si aspetterebbe una maggiore attività della CAT negli animali esposti per 7 gg a 500 ng/L, cosa che invece non è successa. Si può ipotizzare che l'eventuale presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotto dalla reazione della SOD sia stato controbilanciato non tanto dall'attività della CAT, ma di quella di altri enzimi come la glutazione perossidasi, non valutata in questo studio. L'attività della CAT nella branchia non ha subito effetti del trattamento con il galaxolide. Per quanto riguarda la ghiandola digestiva, invece, l'unico trattamento che ha rivelato una differenza significativa è quello dato dalla concentrazione di 100 ng/L a 7 gg di esposizione, con un aumento dell'attività rispetto al controllo. Una variazione che tende comunque a rientrare nei valori del controllo già alla seconda settimana di esposizione. Con i risultati ottenuti, non è possibile allo stato attuale ipotizzare l'insorgenza di una condizione di stress ossidativo indotta dal galaxolide. I dati di letteratura riguardo l'influenza del galaxolide sull'attività di SOD e CAT negli organismi marini sono assenti. Inoltre, le concentrazioni testate in altri studi sono generalmente superiori a quelle utilizzate nel presente lavoro di tesi. In uno studio condotto su *Danio rerio* si è osservato un aumento dell'attività della SOD alle concentrazioni di 0.37 mg/L e 0.17 mg/L al secondo giorno di esposizione al contaminante (Zhang et al., 2012). Nel fegato del pesce *Carassius auratus* sono state determinate le attività di entrambi gli enzimi antiossidanti: le concentrazioni più alte testate (15, 75 e 150 µg/L) hanno dato un incremento della SOD dopo 14 gg di esposizione e per la CAT dopo 14 e 21 gg (Chen et al., 2012). Per quanto riguarda *R. philippinarum*, un precedente studio ha evidenziato che il triclosan alle concentrazioni di 600 ng/L e 900 ng/L può indurre un aumento dell'attività della SOD nella branchia e una riduzione dell'attività nella ghiandola digestiva (Matozzo et al., 2012c). Tali concentrazioni non hanno determinato invece alcun cambiamento nella CAT di entrambi i tessuti (Matozzo et al., 2012c). In Milan et al. (2013) è stata osservata una significativa riduzione dell'attività della SOD nella ghiandola digestiva delle vongole, dopo 5 e 7 gg di esposizione alle concentrazioni di 100 µg/L e 1000 µg/L di ibuprofene. Uno studio condotto su più contaminanti (carbamazepina, diclofenac e ibuprofene a concentrazioni di circa 15 µg/L) ha mostrato diversi trend nell'attività di SOD e CAT in *R. philippinarum* nel tempo, sia nella ghiandola digestiva che nelle branchie (Trombini et al., 2019). Comunque, le vongole hanno dimostrato una tendenza al recupero delle attività degli antiossidanti verso la fine dell'esposizione (Trombini et al., 2019).

Il glutazione è un tripeptide in grado di legare svariati composti nocivi, come le specie ROS (Smith et al., 1988). Per espletare la sua funzione, necessita dell'attività di diversi enzimi. Tra questi, la GR rende nuovamente disponibile il glutazione trasformandolo dalla sua forma



ossidata GSSG alla sua forma ridotta GSH. Invece, la GST permette al GSH di coniugarsi con le specie reattive nocive, catalizzandone la reazione e favorendo la loro eliminazione. Nel presente lavoro, l'attività della GR è stata determinata sia nella branchia che nella ghiandola digestiva, mentre l'attività della GST è stata determinata solamente nella ghiandola digestiva. Da quanto si è potuto osservare, la GR non ha evidenziato alcun cambiamento significativo dell'attività in entrambi i tessuti analizzati. Allo stesso modo, l'attività della GST non è cambiata in maniera significativa. I dati ottenuti sono in netto contrasto con quelli di Ehiguese et al. (2020). In tale lavoro gli autori hanno esposto lo stesso organismo modello utilizzato nel presente studio, *R. philippinarum*, a diverse concentrazioni di galaxolide (0.005, 0.05, 0.5, 5 e 50 µg/L). Hanno rilevato nella ghiandola digestiva una significativa diminuzione dell'attività della GR per tutte le concentrazioni testate per ogni tempo di campionamento (3, 7, 14 e 21 giorni) (Ehiguese et al., 2020). Allo stesso modo, hanno rilevato un significativo aumento dell'attività della GST per tutte le concentrazioni e a ogni tempo di esposizione (con la sola eccezione della concentrazione più bassa a 7 giorni) (Ehiguese et al., 2020). Alla luce di quei risultati, gli autori hanno evidenziato la capacità del galaxolide di indurre stress ossidativo in *R. philippinarum* (Ehiguese et al., 2020). Forse la differenza dei risultati tra il presente studio e quello appena citato potrebbe essere attribuita a differenze metodologiche: per la GR, Ehiguese e colleghi (2020) utilizzano un metodo in micropiastra adattato da Martín-Díaz et al. (2007), mentre nel presente lavoro si è utilizzato il metodo sviluppato da Smith et al. (1988). L'attività della GST invece è stata determinata da Ehiguese e colleghi (2020) con il metodo usato da Balk e Ford (1999), mentre qui è stato utilizzato il metodo proposto da Habig et al. (1974). Comunque, sono necessarie ulteriori analisi per definire meglio le cause di questi dati discordanti. In un altro studio, Trombini et al. (2019) hanno evidenziato che l'esposizione a 15 µg/L di carbamazepina, 15 µg/L di diclofenac e 15 µg/L di ibuprofene può indurre un iniziale aumento dell'attività dei due enzimi nella ghiandola digestiva delle vongole, seguita da una sua riduzione nel tempo.

#### 4.2.2 Carbonilazione delle proteine

L'azione dei ROS e altri agenti ossidanti può portare ad una ossidazione e modificazione delle proteine, come ad esempio la formazione di gruppi carbonilici (Valavanidis et al., 2006), chiamata carbonilazione. Questa consiste nella modificazione irreversibile di catene laterali amminoacidiche (principalmente lisina, arginina, prolina e istidina) in gruppi carbonilici quali aldeidi e chetoni (Kaloyianni et al., 2009). La carbonilazione si traduce in diversi effetti sulle proprietà delle proteine, tra le quali aggregazione, inattivazione e degradazione

(Kaloyianni et al., 2009), dando così un danno ossidativo. Una maggiore presenza di ROS nella cellula, dovuto ad esempio ad una esposizione a contaminanti (Livingstone, 2001; Valavanidis et al., 2006; Kaloyianni et al., 2009), può causare la carbonilazione delle proteine. La misura dei livelli di gruppi carbonilici nelle proteine, quindi, è utilizzata in ecotossicologia come indice di un possibile danno ossidativo dato da esposizione a xenobiotici, e si esegue con un saggio chiamato PCC (*Protein Carbonyl Content*) (Kaloyianni et al., 2009). Normalmente, le proteine ossidate si accumulano nell'organismo come fenomeno dell'invecchiamento o come conseguenza di alcune patologie quali l'arteriosclerosi (Valavanidis et al., 2006). Il continuo accumulo di proteine ossidate, sia da esposizione a xenobiotici che da invecchiamento, concorre ad una riduzione della capacità dell'organismo nella degradazione di tali proteine, con conseguenze sui meccanismi di trascrizione cellulari (Valavanidis et al., 2006).

I livelli di PCC in questo lavoro sono stati determinati in entrambi i tessuti. Sia nella branchia che nella ghiandola digestiva, non sono stati notati aumenti significativi dei livelli di PCC in *R. philippinarum* dopo esposizione a galaxolide. Nel mitilo d'acqua dolce *Dreissena polymorpha*, l'esposizione a 500 ng/L di galaxolide ha determinato un sostanziale aumento della quantità di gruppi carbonilici nelle proteine dopo 21 giorni di esposizione al contaminante (Parolini et al., 2015). In letteratura sono disponibili pochi studi sui livelli di PCC dopo esposizione a PPCPs in *R. philippinarum*. In un recente studio sul fullerene C<sub>60</sub>, una nanoparticella dai numerosi impieghi, è stato evidenziato che l'esposizione a 10 µg/L causa nella branchia di *R. philippinarum* un aumento della carbonilazione delle proteine dopo 7 giorni di esposizione (Marisa et al., 2021). Anche l'ossido di titanio TiO<sub>2</sub> causa un incremento dei livelli di PCC nella ghiandola digestiva della vongola, dopo un giorno di esposizione alla concentrazione di 10 µg/L (Marisa et al., 2018). Da quanto osservato nel presente lavoro, comunque, non ci sono elementi che portino ad ipotizzare un danno ossidativo alle proteine da parte del galaxolide in *R. philippinarum*, almeno per le concentrazioni testate.

### **4.3 Attività dell'acetilcolinesterasi**

L'acetilcolina è un neurotrasmettitore che opera tra le giunzioni sinaptiche, responsabile della trasmissione del segnale nervoso ai recettori colinergici (Sandahl & Jenkins, 2002). Una volta trasmesso il segnale, l'enzima AChE catalizza l'idrolisi dell'acetilcolina in colina e acido acetico (Brahma & Gupta, 2020), ponendo così fine alla trasmissione del segnale neurale (Sandahl & Jenkins, 2002). Questo sistema di neurotrasmissione è largamente diffuso nel regno animale, sebbene negli invertebrati non sia stato ben caratterizzato come nei

vertebrati (Fulton & Key, 2001). Un'eventuale inibizione dell'attività dell'AChE porta ad un accumulo di acetilcolina nello spazio inter-sinaptico, dando una stimolazione continua dei recettori colinergici (Sandahl & Jenkins, 2002). Si ha così un danno a carico del sistema nervoso dell'organismo, che nei casi più gravi può dare origine a convulsioni e paralisi (Fulton & Key, 2001). In passato, l'inibizione dell'AChE è stata largamente usata come biomarker di neurotossicità di pesticidi carbammati e organofosfati, in pesci e invertebrati (Hook et al., 2014). Negli ultimi anni, comunque, l'inibizione dell'AChE è stata osservata anche per altre classi di contaminanti, come detergenti, metalli pesanti e PAHs (Ozkan et al., 2017).

Nel presente lavoro di tesi si è voluto verificare se il galaxolide potesse agire come neurotossico in *R. philippinarum*. A questo fine, è stata determinata l'attività dell'AChE nella branchia, essendo questo organo il primo a contatto con i contaminanti in acqua. Dai risultati ottenuti si evince che l'esposizione a 100 ng/L per 14 gg ha indotto un aumento dell'attività dell'AChE rispetto al controllo. Anche se non in maniera statisticamente significativa, è stata notata una generale tendenza all'incremento dell'attività dopo esposizione per 7 gg e a 21 gg a 100 ng/L. Questo inusuale aumento può essere spiegato come una risposta dell'organismo per mitigare un possibile effetto neurotossico del galaxolide. Questa ipotesi è stata avanzata anche in un simile esperimento condotto da Milan et al. (2013) su *R. philippinarum* esposto a ibuprofene. In quello studio l'aumento è stato registrato dopo una iniziale inibizione dell'attività, seguito successivamente da un nuovo calo (Milan et al., 2013). Al momento, non vi sono in letteratura studi che illustrino gli effetti del galaxolide sull'attività dell'AChE. Trombini et al. (2019) hanno osservato che in *R. philippinarum* l'esposizione al diclofenac può causare un significativo aumento dell'attività dell'enzima nella ghiandola digestiva e nella branchia per tutti i contaminanti testati (carbamazepina, diclofenac e ibuprofene) (Trombini et al., 2019). Gli autori attribuiscono l'aumento dell'attività dell'AChE a un potenziale effetto neurotossico correlato alla produzione di specie ROS (Trombini et al., 2019). Un significativo calo dell'attività è stato invece notato nella branchia di *R. philippinarum* dopo esposizione a 300 ng/L e 900 ng/L di triclosan per 7 giorni (Matozzo et al., 2012b). Sulla base dei dati ottenuti in questa tesi e delle informazioni disponibili in letteratura, si può affermare che occorrono altri studi per determinare l'eventuale potenziale neurotossico del galaxolide e di altri contaminanti appartenenti alla stessa categoria (fragranze e prodotti per l'igiene personale).

### 4.3 Analisi chimiche

La laguna di Venezia è stata negli anni oggetto di studio per quanto concerne lo sversamento e il trasporto di contaminanti di diverso tipo (Sommerfreund et al., 2010). In particolare, l'apporto di contaminanti negli anni '50-'80 ha determinato un loro notevole accumulo nei sedimenti della laguna (Sommerfreund et al., 2010). Ancora oggi, le attività industriali e il traffico marittimo sono fonte di inquinamento nella laguna di Venezia (Ademollo et al., 2017), portando le autorità regionali a dichiarare un terzo del territorio lacustre come non utilizzabile per le attività di piscicoltura (DGR3366/2004) (Milan et al., 2016). Dati l'elevato uso e il continuo apporto in ambiente di galaxolide (Vallecillos et al., 2015), si è voluto determinare se questo contaminante fosse presente e in che concentrazioni all'interno dell'acqua di mare utilizzata per l'esposizione. In parallelo alle analisi biochimiche, perciò, sono state condotte delle analisi chimiche per determinare un eventuale valore di fondo ambientale (*background value*) di galaxolide nell'acqua di mare. Questa determinazione è stata necessaria, inoltre, per valutare se in aggiunta al trattamento di esposizione delle vongole al galaxolide bisognasse tenere in considerazione un contributo dato dalla contaminazione in ambiente. Dai risultati delle analisi condotte in GC-MS, si sono ottenuti valori di concentrazione al di sotto del LLOQ per due campioni (le due repliche campionate a 7 gg) e valori al di sotto del LOD per il resto dei campioni raccolti. Di conseguenza, non si può affermare che vi sia presenza del galaxolide all'interno dell'acqua di mare. È da sottolineare il fatto che si è rilevato, durante il processo di validazione del metodo analitico, la presenza di galaxolide all'interno del laboratorio di analisi. È già stato evidenziato in altri studi, infatti, che il largo utilizzo di galaxolide nei prodotti per la persona e per la pulizia domestica può portarne ad una concentrazione relativamente elevata nell'aria *indoor* (Lucattini et al., 2018). Queste concentrazioni possono andare dalle decine alle centinaia di ng/m<sup>3</sup>, a seconda degli ambienti considerati (Lucattini et al., 2018). Si è dovuto determinare per questo motivo il valore di fondo di galaxolide del laboratorio di analisi. Questo ha dato un valore equivalente ad un segnale corrispondente ad una concentrazione di 13.4 ng/L in acqua di mare. Il bianco del metodo, utilizzato per il calcolo del LLOQ e del LOD, può così avere impedito la determinazione di una eventuale presenza in tracce del galaxolide nell'acqua di mare. In letteratura, sono presenti pochi dati riguardo la concentrazione di galaxolide presente in acqua marina. Uno studio condotto lungo l'estuario del fiume Tamar (Cornwall, UK) e la prospiciente zona costiera, ha registrato concentrazioni da 6 a 28 ng/L, con i valori più alti nei siti di campionamento più vicini agli scarichi di impianti di

trattamento delle acque (Sumner et al., 2010). Una campagna di *screening* di contaminanti organici lipofili nella Baia Tedesca nel Mare del Nord ha riportato concentrazioni di galaxolide da 0.09 a 4.8 ng/L (Bester et al., 1998). Un'altra campagna di *screening* condotta sui sedimenti della parte settentrionale del mare Adriatico ha determinato all'interno di questi valori di galaxolide di 4.3 ng/g (Combi et al., 2016). Da quanto ottenuto con il presente lavoro di tesi, non vi sono dati che possano affermare la presenza di galaxolide all'interno dell'acqua della laguna di Venezia.

È già stato più volte sottolineato come il largo uso di galaxolide ne comporti un continuo apporto in ambiente (Vallecillos et al., 2015). Data la natura lipofila della molecola, questa tende ad essere assorbita ed accumulata negli organismi (Balk & Ford, 1999b; Tumová et al., 2019). Si è voluto perciò determinare l'eventuale presenza del contaminante in esemplari di *R. philippinarum* pescati in zone di concessione della laguna di Venezia nei pressi di Chioggia (VE), attraverso un'analisi *screening* di tutti i contaminanti rilevabili al loro interno. Dai risultati ottenuti dall'analisi HPLC-HRMS, non si è determinata la presenza di galaxolide per nessuno dei campioni considerati, come anche non si è determinato il suo principale metabolita galaxolidone. Tuttavia, è da tenere presente che gli esemplari utilizzati per questa analisi sono stati quelli avanzati dalla battuta di pesca del settembre 2020 e mantenuti in stanza termostatica, causa mancata reperibilità di nuovo pescato. Questi sono stati mantenuti alle condizioni indicate al §2.10 per circa un mese, il che potrebbe avere permesso una eventuale metabolizzazione ed eliminazione del galaxolide. In letteratura ad oggi non sono presenti informazioni riguardanti il percorso metabolico del galaxolide in *R. philippinarum*. Alla luce di quanto illustrato, dal presente studio non vi sono dati in grado di definire la presenza di galaxolide all'interno dei tessuti delle vongole *R. philippinarum* pescate nella laguna di Venezia.

Organismi marini quali mitili e vongole sono frequentemente utilizzati come strumenti per il biomonitoraggio, in qualità della loro elevata capacità filtrante (Ademollo et al., 2017). Attraverso l'alimentazione, sono in grado di accumulare nei loro tessuti elevate quantità di contaminanti presenti nella colonna d'acqua, e di concentrarli al loro interno (Ademollo et al., 2017). Per questo motivo possono fornire un indice sull'inquinamento dell'ambiente nel quale si trovano, andando a determinare gli inquinanti presenti al loro interno. Gli invertebrati marini della laguna di Venezia sono tuttora utilizzati come bioindicatori per valutare l'inquinamento di acqua e sedimenti della zona (Ademollo et al., 2017; Sfriso et al., 2018). Ad esempio, sono stati utilizzati per valutare la contaminazione di metalli pesanti

(Sfriso et al., 2018), e composti organici quali alchilfenoli e PAHs (Ademollo et al., 2017) in laguna. Avendo eseguito un'analisi *screening* con HPLC-HRMS degli estratti di vongole per determinare la presenza di galaxolide, si è condotta una ricerca *untarget* anche di altri possibili contaminanti. Dai *match* positivi ottenuti con il software Compound Discoverer 3.2 e relativi database, sono stati individuati quattro composti di origine sintetica, non presenti naturalmente nelle vongole e perciò definibili come contaminanti: due farmaci antivirali (Lopinavir e Ritonavir) e due diesteri sintetici (di-(2-etilesil)-sebacato e di-(2-etilesil)-adipato). Il Lopinavir e il Ritonavir sono due confermati antiretrovirali inibitori della proteasi, utilizzati nelle terapie HAART (*Highly active antiretroviral therapy*) per il trattamento delle infezioni da virus HIV-1 (Chandwani & Shuter, 2008). In commercio si trovano in miscela precostituita con il nome commerciale di Kaletra<sup>®</sup>, un farmaco prodotto e venduto dalla Abbott S.p.A e ampiamente utilizzato nelle terapie per persone affette da AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) (Chandwani & Shuter, 2008). Ad oggi, in letteratura non sono presenti dati di accumulo di Lopinavir e di Ritonavir all'interno di *R. philippinarum* o di altri molluschi marini, come non vi sono dati ecotossicologici. Secondo un rapporto redatto dall'EMA (European Medicines Agency), una valutazione dei rapporti PEC/PNEC (*Predicted environmental concentration/Predicted no effect concentration*) calcolati per le due molecole ha portato l'Ente ad affermare che sembrerebbero non rappresentare un rischio per l'ambiente (EMA, 2006). Tuttavia, per il Lopinavir è stato stimato un BCF di 2200, il quale suggerisce un potenziale di bioaccumulo molto alto negli organismi acquatici, indicando inoltre l'incapacità di essere metabolizzato (PubChem, 2021). Il di-(2-etilesil)-sebacato (DEHS) e il di-(2-etilesil)-adipato (DEHA) sono due composti organici sintetici, diesteri del 2-etilesanolo con rispettivamente l'acido sebacico e l'acido adipico. Sono prevalentemente utilizzati in industria come plasticizzanti nei materiali plastici, per migliorarne le proprietà tecniche e di durata (Hahladakis et al., 2018), e come additivi negli olii idraulici. L'interesse ambientale di questi additivi è legato alla crescente attenzione posta sulle microplastiche rilasciate negli ecosistemi marini (Al-Salem et al., 2020), anche se manca tuttora una caratterizzazione ambientale e tossicologica adeguata. È stato dimostrato come plasticizzanti come il DEHA siano in grado di migrare dalle plastiche delle confezioni alimentari ai cibi grassi che vi sono contenuti (Hahladakis et al., 2018). Un'indagine sui composti plasticizzanti presenti nelle acque al largo della Tunisia ha riportato una concentrazione di DEHA nei sedimenti marini di 3.08 mg/kg dw e una concentrazione nei tessuti di pesci *Sparus aurata* di 3.04 mg/kg dw (Jebara et al., 2021). Ad

oggi, non sono presenti in letteratura dati sulla presenza di DEHA e DEHS nella laguna di Venezia, come anche sul loro accumulo in bivalvi come *R. philippinarum*.

Avendo sviluppato un metodo strumentale per l'analisi del galaxolide nell'acqua marina al GC-MS, si è voluto eseguire una analisi *screening* con lo stesso metodo per una ricerca *untarget* dei contaminanti presenti nelle vongole. Anche con questo metodo, non si è rilevata la presenza di galaxolide all'interno degli animali. Invece, sono stati identificati tramite confronto con NIST Database altri due contaminanti xenobiotici: la nicotina e il Cinerin II. La nicotina è una rinomata molecola naturale presente nelle foglie di tabacco, e viene quindi assunta in grandi quantità con il fumo di sigaretta (Leslie, 2020). Data la sua importanza farmacologica e tossicologica, è stata oggetto negli anni di innumerevoli studi (Jackson et al., 2020). Dal punto di vista ambientale, l'estensivo consumo di sigarette nella popolazione è causa di un massiccio apporto di nicotina negli ecosistemi acquatici (Araújo & Costa, 2019; Müller et al., 2020). I mozziconi di sigaretta, non smaltiti in maniera adeguata dai consumatori, vanno a rilasciare i componenti al loro interno nelle acque, specialmente nicotina, PAHs e metalli (Araújo & Costa, 2019). Per questo motivo, la nicotina è uno dei maggiori PCPPs rilevabili in corpi idrici soggetti a influenza antropica (Chaturvedi et al., 2021; Ebele et al., 2017). Non sono tuttavia presenti in letteratura dati riguardanti il bioaccumulo di nicotina in *R. philippinarum*. Le piretrine sono una famiglia di insetticidi organici, originariamente estratte dai fiori di *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Anadón et al., 2009). Sono ampiamente utilizzate in medicina veterinaria, ambienti domestici e agricoltura come pesticidi assieme ai loro analoghi sintetici, i piretroidi (Anadón et al., 2009). A differenza di questi ultimi, le piretrine sono maggiormente degradabili alla luce, rappresentando una alternativa *environmental-friendly* ai loro rispettivi sintetici (Anadón et al., 2009). I composti costituenti la famiglia delle piretrine sono sei: Pyrethrin I, Pyrethrin II, Cinerin I, Cinerin II, Jasmolin I e Jasmolin II (Anadón et al., 2009). Di questi, il Cinerin II è stato ritrovato nei campioni di vongole analizzate. Nella letteratura scientifica, è stata posta maggiore attenzione sull'accumulo e sugli effetti dei composti sintetici piretroidi (Bradbury & Coats, 1989), piuttosto che sulle piretrine naturali. Per cui, non si ritrovano dati scientifici sull'accumulo e la tossicità del Cinerin II su organismi marini. Alla luce di quanto fin qui esposto, si rendono necessari ulteriori studi per verificare il possibile accumulo della nicotina e del Cinerin II all'interno dei tessuti di molluschi marini e i loro eventuali effetti tossici.

Gli esemplari di *R. philippinarum* analizzati per la determinazione *untarget* dei contaminanti al loro interno sono stati prelevati dopo il loro mantenimento per circa 30 gg all'interno di un sistema artificiale, con ricambio di acqua prelevata presso Chioggia. Per questo motivo, si è dovuto condurre un'analisi *screening* anche dell'acqua di mare utilizzata, per valutare se la presenza dei contaminanti nelle vongole fosse derivata dalla esposizione all'acqua di mantenimento. I risultati delle analisi in HPLC-HRMS hanno confermato la presenza di Lopinavir, Ritonavir, DEHS e DEHA anche nell'acqua di mare. Perciò, è da considerare che l'accumulo di questi contaminanti nelle vongole possa essere dovuto all'esposizione dell'acqua utilizzata nella vasca di mantenimento, e non dalla loro assunzione in ambiente. Nondimeno, può essere il risultato di una combinazione di entrambe le esposizioni. Non essendo legata ai fini del presente studio, non si è indagato sulla quantificazione del bioaccumulo di questi contaminanti in *R. philippinarum*. In aggiunta, non si è eseguita una verifica della presenza di nicotina e Cinerin II nell'acqua di mare. Entrambi questi aspetti rimangono perciò da investigare in futuro, per una migliore caratterizzazione degli inquinanti nell'ecosistema marino della laguna di Venezia. Mentre la presenza di DEHS e DEHA nelle acque nei pressi di Chioggia non stupisca per i motivi illustrati precedentemente, la presenza dei due farmaci rimane di dubbia origine. Una possibile spiegazione può essere data dalla odierna pandemia globale dovuta al virus SARS-CoV-2 (denominato anche COVID-19). Difatti, nell'aprile 2020 il farmaco Kaletra® è stato autorizzato in Italia come medicinale nella terapia di pazienti adulti affetti dal virus, in mancanza di altri strumenti efficaci (AIFA, 2020a). L'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) ha permesso l'utilizzo *off-label* del formulato per il trattamento dei pazienti infetti, sia nelle terapie ospedaliere che in quelle domiciliari (Ministero della Salute, 2020), salvo poi revocare l'autorizzazione a fine luglio 2020 limitandola ai casi clinici (AIFA, 2020b). A Chioggia è presente un ospedale cittadino, come anche una casa di riposo, a meno di 2.5 km dal punto di prelievo dell'acqua marina a Punta Poli (Figura 4.1). La residenza per anziani F. Casson è una casa di riposo situata a Sottomarina, nel Comune di Chioggia. Nell'aprile 2020, la struttura è stata investita da un aumento considerevole dei casi di COVID-19 tra i pazienti e il personale sanitario (Radio Clodia FM, 2020a,b; RaiNews, 2020a). L'ospedale ULSS 3 Serenissima, situato anch'esso a Sottomarina di Chioggia, come la quasi totalità delle strutture sanitarie della Regione ha dovuto affrontare l'emergenza sanitaria per tutto il decorso della pandemia (Radio Clodia FM, 2020c; RaiNews, 2020b; SIVeMP, 2020). È dunque possibile che la gran quantità di ricoveri durante il periodo di primavera 2020 abbia portato



ad un largo utilizzo del farmaco Kaletra® per le terapie e ad una sua conseguente immissione nella rete fognaria. Questo, unito ad una eventuale inefficienza dei trattamenti di depurazione delle acque reflue, può aver contribuito al rilascio di Lopinavir e Ritonavir nelle acque della laguna. È da precisare che, durante il prelievo dell'acqua di mare, si è avuta l'accortezza di attendere la corrente di marea entrante, la quale non dovrebbe giungere dall'abitato di Chioggia e quindi dovrebbe essere meno carica di inquinanti. In conclusione, tutte queste osservazioni necessitano di ulteriori prove per definire se e come vi sia un apporto di farmaci antivirali nella laguna di Venezia, come conseguenza delle terapie per il virus SARS-CoV-2.



**Figura 4.1** - Mappa degli abitati di Chioggia e Sottomarina di Chioggia, con indicati il punto di prelievo dell'acqua di mare a Punta Poli (rosso), la locazione della casa per anziani R.S.A. F. F. Casson (arancio) e la locazione dell'ospedale cittadino (croce rossa).

L'analisi *screening* in HPLC-HRMS dell'acqua di mare ha fornito altri dati riguardo la presenza di contaminanti al suo interno. In aggiunta a quelli sopra descritti, sono stati trovati altri quattro composti di origine sintetica: il diisodecil-ftalato (DIDP), la N-isopropil-N'-fenil-p-fenilendiammina (IPPD), la Alverina e la N,N'-dicicloesilurea (Appendice C). Questi composti non sono stati trovati nella medesima analisi condotta sui campioni di vongole. Il DIDP è uno ftalato utilizzato come plasticizzante in pellicole alimentari e imballaggi, che ha mostrato la capacità di trasferirsi dalle confezioni plastiche ai cibi grassi contenuti al loro interno (Hahladakis et al., 2018), come illustrato precedentemente per il DEHA. La IPPD è una ammina aromatica secondaria, utilizzata come additivo antiossidante nella produzione

della gomma (Polovková et al., 2006). L'Alverina è un principio antispasmodico che induce un rilassamento nei muscoli di tipo liscio (Rathod et al., 2017). Per questa sua proprietà, viene utilizzata come farmaco per i disordini gastrointestinali (Rathod et al., 2017). La N,N'-dicicloesilurea è un composto organico della famiglia delle uree, senza un particolare utilizzo industriale o medico. Recentemente, è stata testata insieme ad altri composti come *drug nanocrystals* a fini farmacologici sui ratti (Gao et al., 2012). Non essendo fondamentali ai fini del presente lavoro di tesi, non si è investigato ulteriormente sulla presenza in ambiente e sulle evidenze ecotossicologiche di queste molecole. Possono però essere utilizzate in futuro come nuovi spunti di indagine per la caratterizzazione di contaminanti emergenti all'interno della laguna di Venezia.

## 5. CONCLUSIONI

L'integrazione delle tecniche di analisi ecotossicologiche con indagini analitiche delle matrici ambientali permettono di ottenere una migliore comprensione degli impatti che le sostanze sintetiche di origine antropica possono avere sugli ecosistemi.

I risultati ottenuti nel presente studio non hanno permesso di definire in maniera esaustiva la pericolosità del galaxolide nei confronti del mollusco *R. philippinarum*, almeno nelle condizioni sperimentali adottate in questa tesi. Dei parametri emocitari analizzati, solo il THC e la proliferazione cellulare hanno subito una variazione dopo l'esposizione al contaminante. Per quanto riguarda gli enzimi antiossidanti, solamente l'attività della SOD nella branchia e della CAT nella ghiandola hanno subito una variazione significativa, salvo poi ritornare a valori simili al controllo. Non è stato registrato un danno ossidativo alle proteine, mentre per l'attività dell'AChE è stata osservata una variazione alla concentrazione più bassa, che però è tornata ai valori di controllo verso la fine dell'esposizione. È da escludere, dunque, che il galaxolide possa indurre effetti di tossicità cronica al sistema immunitario o danni di tipo ossidativo in *R. philippinarum* alle concentrazioni testate.

Per quanto riguarda le analisi dell'acqua di mare e degli esemplari di vongole pescate nella laguna di Venezia, non sembrano esservi evidenze di galaxolide per nessuno dei campioni esaminati. Tuttavia, la presenza di composti di origine sintetica quali Lopinavir, Ritonavir, DEHS e DEHA in entrambe le matrici analizzate conferma il forte impatto antropico nell'ecosistema lagunare, evidenziando anche la possibilità di questi contaminanti di essere accumulati negli organismi filtratori.

Da quanto esaminato nel presente lavoro di tesi, emerge la necessità di ulteriori studi per caratterizzare al meglio gli effetti del galaxolide nell'ambiente marino. Nonostante in *R. philippinarum* non siano stati osservati particolari effetti, sarebbe interessante valutare la sensibilità al composto di altri organismi modello, verificando anche l'eventuale concomitante effetto di altri fattori di stress, come la variazione di temperatura, salinità e pH. Infine, si sottolinea l'importanza di eseguire approfondite indagini analitiche nell'ambiente marino, al fine di caratterizzare e quantificare l'apporto di contaminanti emergenti di origine sintetica. Questo risulta un passaggio fondamentale per la migliore comprensione dell'entità dell'impatto antropico sull'ecosistema della laguna di Venezia.

## NOMENCLATURA

### Formule

|               |  |
|---------------|--|
| BAF           | Bioaccumulation factor (L/kg)  |
| BCF           | Bioconcentration factor (L/kg)   |
| $C_B$         | Concentrazione di un analita target o del precursore nel biota (mg/kg) |
| $C_W$         | Concentrazione del composto precursore in acqua (mg/L)                 |
| $\log K_{oc}$ | Logaritmo del coefficiente di partizione carbonio organico/acqua (-)   |
| $\log K_{ow}$ | Logaritmo del coefficiente di partizione ottanolo/acqua (-)            |

### Acronimi

|      |   |
|------|---|
| ACh  | Acetilcolina                            |
| AChE | Acetilcolinesterasi                     |
| ACMs | Alicyclic Musk fragrances               |
| ADBI | Celestolide, Crysolide                  |
| AETT | Versalide                               |
| AHMI | Phantolide                              |
| AHTN | Tonalide                                |
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome     |
| AIFA | Agenzia Italiana del Farmaco            |
| ATC  | Acetiltiocolina                         |
| ATII | Traseolide                              |
| CAT  | Catalasi                                |
| CDNB | 2,4-dinitroclorobenzene                 |
| DDT  | Para-diclorodifeniltricloroetano        |
| DEHA | Di-(2-etilesil)-adipato                 |
| DEHS | Di-(2-etilesil)-sebacato                |
| DNPH | 2,4-dinitrofenilidrazina                |
| DTNB | acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico |
| d.w. | Dry weight                              |
| EDs  | Endocrine Disruptors                    |
| EI   | Electron ionization                     |
| EIC  | Extracted ion chromatogram              |
| EMA  | European Medicines Agency               |

|                      |  |
|----------------------|--|
| EPs                  | Emerging Pollutants                            |
| ESI                  | Electrospray ionization                        |
| FS                   | Full Scan                                      |
| FS-ddMS <sup>2</sup> | Full Scan - data dependent MS/MS fragmentation |
| GC                   | Gascromatografo                                |
| GR                   | Glutazione reduttasi                           |
| GSH                  | Glutazione                                     |
| GST                  | Glutazione S-transferasi                       |
| HAART                | Highly active antiretroviral therapy           |
| HHCB                 | Galaxolide                                     |
| HPLC                 | High Performance Liquid Chromatography         |
| HPV                  | High Production Volume Chemical List Database  |
| HRMS                 | High Resolution Mass Spectrometer              |
| IS                   | Internal standard                              |
| LDH                  | Lattato deidrogenasi                           |
| LLOQ                 | Lower limit of quantification                  |
| LOD                  | Limit of detection                             |
| LPO                  | Perossidazione lipidica                        |
| l.w.                 | Lipid weight                                   |
| MA                   | Musk Ambrette                                  |
| MCMs                 | Macrocyclic Musk fragrances                    |
| MK                   | Musk Ketone                                    |
| MM                   | Musk Moskene                                   |
| MS                   | Mass Spectrometer                              |
| MT                   | Musk Tibetene                                  |
| MX                   | Musk Xylene                                    |
| MXR                  | Multixenobiotic resistance                     |
| NADPH                | Nicotinammide adenina dinucleotide fosfato     |
| NMs                  | Nitro Musk fragrances                          |
| RNS                  | Reactive nitrogen species                      |
| PAHs                 | Polycyclic Aromatic Hydrocarbons               |
| PCC                  | Protein Carbonyl Content                       |
| PCMs                 | Polycyclic Musk fragrances                     |

|        |  |
|--------|--|
| PCBs   | Polychlorinated Biphenyl substances                              |
| PCPs   | Personal Care Products   |
| PEC    | Predicted environmental concentration                            |
| PFAS   | Per- and polyfluoroalkyl substances                              |
| PNEC   | Predicted no effect concentration                                |
| POPs   | Persistent Organic Pollutants                                    |
| PCCPs  | Pharmaceutical and Personal Care Products                        |
| QqQ    | Triplo quadrupolo  |
| REACH  | Regulation Evaluation Authorization and Restriction of Chemicals |
| ROS    | Reactive oxygen species  |
| SDL    | Screening detection limits                                       |
| SOD    | Superossido dismutasi  |
| SPE    | Solide Phase Extraction  |
| SRM    | Single Reaction Monitoring                                       |
| TCA    | Acido tricloroacetico  |
| THC    | Total hemocyte count   |
| TIC    | Total ion current  |
| TNB    | Acido 2-nitro-5-tiobenzonico                                     |
| US-EPA | Environmental Protection Agency of United States                 |
| XTT    | Sale di tetarazolio  |
| w.w.   | Wet weight   |
| WWTPs  | Wastewater Treatment Plants                                      |

## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Valerio Matozzo per l'opportunità di tesi che mi ha offerto, come anche la Prof.ssa Sara Bogialli per la collaborazione necessaria alla riuscita del presente lavoro. Un sentito ringraziamento va a coloro che hanno permesso l'esecuzione operativa delle analisi di laboratorio: al Dott. Marco Refosco per la parte di analisi chimiche e al Dott. Jacopo Fabrello per la parte di analisi biochimiche.

Un affettuoso grazie va a chi mi ha sostenuto in questi anni.

A mia madre Paola, mio padre Giovanni, mia sorella Irene e mio fratello Giacomo. A voi la mia più grande gratitudine, per quello che siete e per avermi sorretto, sempre.

Ai miei amici e ai miei cugini, per ricordarmi di non essere solo e per riportarmi alle mie radici, ai miei boschi, alle mie valli.

Un grazie speciale a colleghi ed amici che mi hanno accompagnato in questi anni di magistrale. In particolare, grazie ad Aurora, Giada, Giorgia e Mara. È stata un'avventura fantastica.

## BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Ademollo N., Patrolecco L., Matozzo V., Marin M.G., Valsecchi S., Polesello S. (2017) Clam bioaccumulation of Alkylphenols and Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Venice lagoon under different pressures. *Marine Pollution Bulletin*, **124**, 121–129.
- Aebi H. (1984) Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, **105**, 121–126.
- AIFA (2020a) Lopinavir/ritonavir nella terapia dei pazienti adulti con COVID-19. AIFA. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40779-020-0233-6> [Accessed February 6, 2021].
- AIFA (2020b) Lopinavir/ritonavir nella terapia dei pazienti adulti con COVID-19. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kalettra-epar-> [Accessed February 6, 2021].
- Al-Salem S.M., Uddin S., Al-Yamani F. (2020) An assessment of microplastics threat to the marine environment: A short review in context of the Arabian/Persian Gulf. *Marine Environmental Research*, **159**, 104961.
- Álvarez-Ruiz R., Picó Y. (2020) Analysis of emerging and related pollutants in aquatic biota. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, **25**, e00082.
- Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Martínez M.A. (2009) Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *Veterinary Journal*, **182**, 7–20.
- Api A.M., Ritacco G., Sipes I.G. (2013) Disposition and excretion of 14C-AHTN (7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene) and 14c-hhcb (1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl-cyclopenta-gamma-2-benzopyran) after intravenous administration to Sprague-Dawley rats and domestic pigs. *International journal of toxicology*, **32**, 288–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685777> [Accessed March 27, 2020].
- Araújo M.C.B., Costa M.F. (2019) A critical review of the issue of cigarette butt pollution in coastal environments. *Environmental Research*, **172**, 137–149.
- Balk F., Ford R.A. (1999a) Environmental risk assessment for the polycyclic musks, AHTN and HHCB. II. Effect assessment and risk characterisation. *Toxicology Letters*, **111**, 81–94.
- Balk F., Ford R.A. (1999b) Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU. I. Fate and exposure assessment. *Toxicology Letters*, **111**, 57–79.
- Bester K. (2009) Analysis of musk fragrances in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 470–480.



- Bester K. (2005) Polycyclic musks in the Ruhr catchment area - Transport, discharges of waste water, and transformations of HHCB, AHTN and HHCB-lactone. *Journal of Environmental Monitoring*, **7**, 43–51.
- Bester K. (2004) Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant. *Chemosphere*, **57**, 863–870. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488577> [Accessed March 19, 2020].
- Bester K., Hühnerfuss H., Lange W., Rimkus G.G., Theobald N. (1998) Results of non target screening of lipophilic organic pollutants in the German Bight. II: Polycyclic musk fragrances. *Water Research*, **32**, 1857–1863.
- Blair B.D., Crago J.P., Hedman C.J., Klaper R.D. (2013) Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere*, **93**, 2116–2123.
- Bradbury S.P., Coats J.R. (1989) Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **108**, 133–177.
- Brahma N., Gupta A. (2020) Acute toxicity of lead in fresh water bivalves *Lamellidens jenkinsianus* *obesa* and *Parreysia* (*Parreysia*) *corrugata* with evaluation of sublethal effects on acetylcholinesterase and catalase activity, lipid peroxidation, and behavior. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **189**, 109939.
- Brausch J.M., Rand G.M. (2011) A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, **82**, 1518–1532.
- Breitholtz M., Wollenberger L., Dinan L. (2003) Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology*, **63**, 103–118.
- Bu Q., Wang B., Huang J., Deng S., Yu G. (2013) Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review. *Journal of Hazardous Materials*, **262**, 189–211. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036145> [Accessed March 20, 2020].
- van der Burg B., Schreurs R., van der Linden S., Seinen W., Brouwer A., Sonneveld E. (2008) Endocrine effects of polycyclic musks: do we smell a rat? *International Journal of Andrology*, **31**, 188–193. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2605.2007.00831.x> [Accessed March 28, 2020].

- CABI (2011) Invasive Species Compendium. *Ruditapes philippinarum* (Japanese carpet shell). Available at: <https://www.cabi.org/isc/> [Accessed December 5, 2020].
- Carson R. (2002) Silent Spring - 40th Anniversary Edition.
- Chandwani A., Shuter J. (2008) Lopinavir/ritonavir in the treatment of HIV-1 infection: A review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, **4**, 1023–1033. Available at: </pmc/articles/PMC2621403/?report=abstract> [Accessed February 5, 2021].
- Chaturvedi P., Shukla P., Giri B.S., Chowdhary P., Chandra R., Gupta P., Pandey A. (2021) Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. *Environmental Research*, **194**, 110664.
- Chen C., Zhou Q., Liu S., Xiu Z. (2011) Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Chemosphere*, **83**, 1147–1154.
- Chen D., Zeng X., Sheng Y., Bi X., Gui H., Sheng G., Fu J. (2007) The concentrations and distribution of polycyclic musks in a typical cosmetic plant. *Chemosphere*, **66**, 252–258.
- Chen F., Gao J., Zhou Q. (2012) Toxicity assessment of simulated urban runoff containing polycyclic musks and cadmium in *Carassius auratus* using oxidative stress biomarkers. *Environmental Pollution*, **162**, 91–97.
- Christian M.S., Parker R.M., Hoberman A.M., Diener R.M., Api A.M. (1999) Developmental toxicity studies of four fragrances in rats. *Toxicology Letters*, **111**, 169–174.
- Combi T., Pintado-Herrera M.G., Lara-Martin P.A., Miserocchi S., Langone L., Guerra R. (2016) Distribution and fate of legacy and emerging contaminants along the Adriatic Sea: A comparative study. *Environmental Pollution*, **218**, 1055–1064.
- Corada-Fernández C., Jiménez-Martínez J., Candela L., González-Mazo E., Lara-Martín P.A. (2015) Occurrence and spatial distribution of emerging contaminants in the unsaturated zone. Case study: Guadalete River basin (Cadiz, Spain). *Chemosphere*, **119**, S131–S137. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24890839> [Accessed March 19, 2020].
- Costa C., Briguglio G., Catanoso R., Giambò F., Polito I., Teodoro M., Fenga C. (2020) New perspectives on cytokine pathways modulation by pesticide exposure. *Current Opinion in Toxicology*, **19**, 99–104.
- Crapo J.D., McCord J.M., Fridovich I. (1978) Preparation and Assay of Superoxide Dismutases. *Methods in Enzymology*, **53**, 382–393.

- Daughton C.G., Ternes T.A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, **107**, 907–938.
- Deblonde T., Cossu-Leguille C., Hartemann P. (2011) Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **214**, 442–448.
- Duong-Ly K.C., Gabelli S.B. (2014) Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation, In *Methods in Enzymology*, pp. 85–94. Academic Press Inc. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24674064/> [Accessed February 1, 2021].
- Ebele A.J., Abou-Elwafa Abdallah M., Harrad S. (2017) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, **3**, 1–16.
- Ehiguese F.O., Alam M.R., Pintado-Herrera M.G., Araújo C.V.M., Martin-Diaz M.L. (2020) Potential of environmental concentrations of the musks galaxolide and tonalide to induce oxidative stress and genotoxicity in the marine environment. *Marine Environmental Research*, **160**, 105019.
- Ehiguese F.O., Fernandez M. del C.C., Lara-Martín P.A., Martín-Díaz M.L., Araújo C.V.M. (2019) Avoidance behaviour of the shrimp *Palaemon varians* regarding a contaminant gradient of galaxolide and tonalide in seawater. *Chemosphere*, **232**, 113–120.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88–95.
- EMA (2006) *Kaletra, INN-lopinavir/ritonavir*. London. Available at: <http://www.emea.eu.int> [Accessed February 5, 2021].
- European Commission (2008) Commission Directive 2008/42/EC of 3 April 2008 amending Council Directive 76/768/EEC, concerning cosmetic products, for the purpose of adapting Annexes II and III thereto to technical progress. *Off. J. Eur. Commun.*, 13-23 L93.
- European Commission (2011) Commission Regulation (EU) No 143/2011 of 17 February 2011 amending Annex XIV to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH). *Off. J. Eur. Commun.*, 2–6 L344.
- Fernandes D., Dimastrogiovanni G., Blázquez M., Porte C. (2013) Metabolism of the polycyclic musk galaxolide and its interference with endogenous and xenobiotic metabolizing

- enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Environmental Pollution*, **174**, 214–221.
- Fisher W.S., Oliver L.M., Edwards P.E. (1996) Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. *Journal of Shellfish Research*, **15**, 554–564.
- Frank W.C. (2005) In Search of Nascent Musks... Or Not!, In *Flavours and Fragrances*, pp. 196–208. Elsevier.
- Franke, Meyer, Heinzl, Gatermann, Huhnerfuss, Rimkus, König, Francke (1999) Enantiomeric composition of the polycyclic musks HHCB and AHTN in different aquatic species. *Chirality*, **11**, 795–801. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561711> [Accessed March 26, 2020].
- Fromme H., Otto T., Pilz K. (2001) Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany). *Water Research*, **35**, 121–128.
- Fulton M.H., Key P.B. (2001) Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 37. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11351414/> [Accessed December 27, 2020].
- Galloway T.S., Depledge M.H. (2001) Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, **10**, 5–23. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008939520263> [Accessed December 24, 2020].
- Gao L., Liu G., Ma J., Wang X., Zhou L., Li X. (2012) Drug nanocrystals: In vivo performances. *Journal of Controlled Release*, **160**, 418–430.
- Gatermann R., Biselli S., Hühnerfuss H., Rimkus G.G., Franke S., Hecker M., Kallenborn R., Karbe L., König W.A. (2002) Synthetic musks in the environment. Part 2: Enantioselective transformation of the polycyclic musk fragrances HHCB, AHTN, AHDI, and ATII in freshwater fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **42**, 447–453.
- Germolec D., Luebke R., Rooney A., Shipkowski K., Vandebriel R., van Loveren H. (2017) Immunotoxicology: A brief history, current status and strategies for future immunotoxicity assessment. *Current Opinion in Toxicology*, **5**, 55–59.
- Gooding M.P., Newton T.J., Bartsch M.R., Hornbuckle K.C. (2006) Toxicity of synthetic musks to early life stages of the freshwater mussel *Lampsilis cardium*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **51**, 549–558.

- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249**, 7130–7139.
- Hahladakis J.N., Velis C.A., Weber R., Iacovidou E., Purnell P. (2018) An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, **344**, 179–199.
- Heberer T., Gramer S., Stan H.J. (1999) Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part III: Determination of synthetic musks in Berlin surface water applying solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, **27**, 150–156.
- Hook S.E., Gallagher E.P., Batley G.E. (2014) The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **10**, 327–341. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24574147/> [Accessed December 27, 2020].
- Hu Z., Shi Y., Cai Y. (2011) Concentrations, distribution, and bioaccumulation of synthetic musks in the Haihe River of China. *Chemosphere*, **84**, 1630–1635.
- Jackson A., Grobman B., Krishnan-Sarin S. (2020) Recent findings in the pharmacology of inhaled nicotine: Preclinical and clinical in vivo studies. *Neuropharmacology*, **176**, 108218.
- Jebara A., Albergamo A., Rando R., Potortì A.G., lo Turco V., Mansour H. ben, di Bella G. (2021) Phthalates and non-phthalate plasticizers in Tunisian marine samples: Occurrence, spatial distribution and seasonal variation. *Marine Pollution Bulletin*, **163**, 111967.
- Kaloyianni M., Dailianis S., Chrisikopoulou E., Zannou A., Koutsogiannaki S., Alamdari D.H., Koliakos G., Dimitriadis V.K. (2009) Oxidative effects of inorganic and organic contaminants on haemolymph of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, **149**, 631–639.
- Kang C.S., Lee J.H., Kim S.K., Lee K.T., Lee J.S., Park P.S., Yun S.H., Kannan K., Yoo Y.W., Ha J.Y., Lee S.W. (2010) Polybrominated diphenyl ethers and synthetic musks in umbilical cord Serum, maternal serum, and breast milk from Seoul, South Korea. *Chemosphere*, **80**, 116–122.
- Kraft P. (2009) Aroma Chemicals IV: Musks, In *Chemistry and Technology of Flavours and Fragrances*, pp. 143–168. Wiley Blackwell.
- Kraft P., Fráter G. (2001) Enantioselectivity of the musk odor sensation, In *Chirality*, pp. 388–394.

- Lee I.S., Kim U.J., Oh J.E., Choi M., Hwang D.W. (2014) Comprehensive monitoring of synthetic musk compounds from freshwater to coastal environments in Korea: With consideration of ecological concerns and bioaccumulation. *Science of the Total Environment*, **470–471**, 1502–1508.
- Leslie F.M. (2020) Unique, long-term effects of nicotine on adolescent brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **197**, 173010.
- Liu J.L., Wong M.H. (2013) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environment International*, **59**, 208–224.
- Livingstone D.R. (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, **42**, 656–666. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11525283/> [Accessed December 24, 2020].
- Lu B., Feng Y., Gao P., Zhang Z., Lin N. (2015) Distribution and fate of synthetic musks in the Songhua River, Northeastern China: influence of environmental variables. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 9090–9099.
- Lucattini L., Poma G., Covaci A., de Boer J., Lamoree M.H., Leonards P.E.G. (2018) A review of semi-volatile organic compounds (SVOCs) in the indoor environment: occurrence in consumer products, indoor air and dust. *Chemosphere*, **201**, 466–482.
- Luckenbach T., Corsi I., Epel D. (2004) Fatal attraction: Synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels, In *Marine Environmental Research*, pp. 215–219.
- Marisa I., Asnicar D., Matozzo V., Martucci A., Finos L., Marin M.G. (2021) Toxicological effects and bioaccumulation of fullerene C60 (FC60) in the marine bivalve *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **207**, 111560.
- Marisa I., Matozzo V., Martucci A., Franceschinis E., Brianese N., Marin M.G. (2018) Bioaccumulation and effects of titanium dioxide nanoparticles and bulk in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research*, **136**, 179–189.
- Martínez-Girón A.B., Crego A.L., González M.J., Marina M.L. (2010) Enantiomeric separation of chiral polycyclic musks by capillary electrophoresis: Application to the analysis of cosmetic samples. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 1157–1165.
- Matozzo V., Ballarin L., Marin M.G. (2002) In vitro effects of tributyltin on functional responses of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum*, In *Applied Organometallic Chemistry*, pp. 169–174.

- Matozzo V., Binelli A., Parolini M., Previato M., Masiero L., Finos L., Bressan M., Marin M.G. (2012a) Biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* and contamination levels in sediments from seaward and landward sites in the Lagoon of Venice. *Ecological Indicators*, **19**, 191–205.
- Matozzo V., Costa Devoti A., Marin M.G. (2012b) Immunotoxic effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology*, **21**, 66–74. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-011-0766-2> [Accessed December 31, 2020].
- Matozzo V., Formenti A., Donadello G., Marin M.G. (2012c) A multi-biomarker approach to assess effects of Triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research*, **74**, 40–46.
- Matozzo V., Gagné F. (2016) Immunotoxicology Approaches in Ecotoxicology: Lessons From Mollusks, In *Lessons in Immunity: From Single-cell Organisms to Mammals*, pp. 29–51. Elsevier Inc.
- Matozzo V., Marin M.G., Cima F., Ballarin L. (2008) First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Cell Biology International*, **32**, 865–868.
- Matozzo V., da Ros L., Ballarin L., Meneghetti F., Gabriella Marin M. (2003) Functional responses of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice: fishing impact and seasonal variations. Available at: <http://cjfas.nrc.ca> [Accessed January 9, 2021].
- Matozzo V., Rova S., Marin M.G. (2012d) The nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, affects the immune parameters in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research*, **79**, 116–121.
- Meador J.P., Yeh A., Young G., Gallagher E.P. (2016) Contaminants of emerging concern in a large temperate estuary. *Environmental Pollution*, **213**, 254–267.
- Mecocci P., Fanó 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. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9895220/> [Accessed January 2, 2021].
- Milan M., Matozzo V., Pauletto M., di Camillo B., Giacomazzo M., Boffo L., Binato G., Marin M.G., Patarnello T., Bargelloni L. (2016) Can ecological history influence response to

- pollutants? Transcriptomic analysis of Manila clam collected in different Venice lagoon areas and exposed to heavy metal. *Aquatic Toxicology*, **174**, 123–133.
- Milan M., Pauletto M., Patarnello T., Bargelloni L., Marin M.G., Matozzo V. (2013) Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. *Aquatic Toxicology*, **126**, 17–29.
- Ministero della Salute (2020) Covid-19, AIFA autorizza nuovo studio di fase III per sperimentazione di Tocilizumab per il trattamento dell'infezione da nuovo coronavirus. *Sito del Ministero della Salute*. Available at: <http://www.salute.gov.it/portale/nuovocoronavirus/dettaglioNotizieNuovoCoronavirus.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=4395> [Accessed February 6, 2021].
- Moldovan Z. (2006) Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, **64**, 1808–1817.
- Monari M., Matozzo V., Foschi J., Cattani O., Serrazanetti G.P., Marin M.G. (2007) Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish and Shellfish Immunology*, **22**, 98–114.
- Montes-Grajales D., Fennix-Agudelo M., Miranda-Castro W. (2017) Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Science of the Total Environment*, **595**, 601–614.
- Moosavi S.M., Ghassabian S. (2018) Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability, In *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*, InTech. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72932> [Accessed January 30, 2021].
- Müller A., Österlund H., Marsalek J., Viklander M. (2020) The pollution conveyed by urban runoff: A review of sources. *Science of the Total Environment*, **709**, 136125.
- Nakata H. (2005) Occurrence of synthetic musk fragrances in marine mammals and sharks from Japanese coastal waters. *Environmental Science and Technology*, **39**, 3430–3434.
- Nakata H., Sasaki H., Takemura A., Yoshioka M., Tanabe S., Kannan K. (2007) Bioaccumulation, temporal trend, and geographical distribution of synthetic musks in the marine environment. *Environmental Science and Technology*, **41**, 2216–2222.
- Niemuth N.J., Klaper R.D. (2015) Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere*, **135**, 38–45.



- Ozkan D., Dagdeviren M., Katalay S., Guner A., Yavaşoğlu N.Ü.K. (2017) Multi-Biomarker Responses After Exposure to Pollution in the Mediterranean Mussels (*Mytilus galloprovincialis* L.) in the Aegean Coast of Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **98**, 46–52.
- Parolini M., Magni S., Traversi I., Villa S., Finizio A., Binelli A. (2015) Environmentally relevant concentrations of galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) induced oxidative and genetic damage in *Dreissena polymorpha*. *Journal of Hazardous Materials*, **285**, 1–10.
- Peakall D., Wong S., Fournier M., Coderre D., Banska W., Krzystyniak K. (1992) Environmental immunotoxicology, In *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*, pp. 167–189. Springer Netherlands.
- Pedersen S., Selck H., Salvito D., Forbes V. (2009) Effects of the polycyclic musk HHCB on individual- and population-level endpoints in *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 1190–1199.
- Peña-Guzmán C., Ulloa-Sánchez S., Mora K., Helena-Bustos R., Lopez-Barrera E., Alvarez J., Rodriguez-Pinzón M. (2019) Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of Environmental Management*, **237**, 408–423.
- Pipe R.K., Coles J.A. (1995) Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology*, **5**, 581–595.
- Pittura L., Avio C.G., Giuliani M.E., d’Errico G., Keiter S.H., Cormier B., Gorbi S., Regoli F. (2018) Microplastics as Vehicles of Environmental PAHs to Marine Organisms: Combined Chemical and Physical Hazards to the Mediterranean Mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Frontiers in Marine Science*, **5**, 103. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2018.00103/full> [Accessed March 19, 2020].
- Polovková J., Kortišová I., Gatial A., Breza M. (2006) On the dehydrogenation of N,N'-substituted p-phenylenediamine antioxidants. I. N-Phenyl-N'-isopropyl-p-phenylenediamine (IPPD). *Polymer Degradation and Stability*, **91**, 1775–1780.
- PubChem (2021) Lopinavir | C37H48N4O5 - PubChem. NIH - National Library of Medicine. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lopinavir#section=Environmental-Fate-Exposure-Summary> [Accessed February 5, 2021].

- Radio Clodia FM (2020a) Casa riposo Chioggia, Baldin: Evitiamo che divenga una trincea del coronavirus a Venezia | Radio Clodia. Available at: <http://www.radioclodia.it/2020/04/06/casa-riposo-chioggia-baldin-evitiamo-che-divenga-una-trincea-del-coronavirus-a-venezia/> [Accessed February 6, 2021].
- Radio Clodia FM (2020b) Controlli nelle RSA, Baldin: “Bene le inchieste. Situazione veneziana preoccupante, le Case di riposo devono essere preparate alla seconda ondata da contagio Covid-19” | Radio Clodia. Available at: <http://www.radioclodia.it/2020/04/20/controlli-nelle-rsa-baldinbene-le-inchieste-situazione-veneziana-preoccupante-le-case-di-riposo-devono-essere-preparate-alla-seconda-ondata-da-contagio-covid-19/> [Accessed February 6, 2021].
- Radio Clodia FM (2020c) Covid-19, a Chioggia 429 positivi, 186 in isolamento e 27 cittadini ricoverati | Radio Clodia. Available at: <http://www.radioclodia.it/2020/11/13/covid-19-a-chioggia-429-positivi-186-in-isolamento-e-27-cittadini-in-terapia-intensiva/> [Accessed February 6, 2021].
- RaiNews (2020a) Case di riposo. Oltre 200 positivi tra Lido, Chioggia e Mestre - Salute - TGR Veneto. Available at: <https://www.rainews.it/tgr/veneto/video/2020/11/ven-Coronavirus-Case-Riposo-Anziani-Venezia-Chioggia-Lido-Spinea-0c7ab99a-fa34-4a64-87de-efcf655d8503.html> [Accessed February 6, 2021].
- RaiNews (2020b) Coronavirus - Storie - TGR Veneto. Available at: <https://www.rainews.it/tgr/veneto/storie/coronavirus-contagio-Veneto-e3da6f68-bb10-40c2-9730-6db261d6a1e8.html> [Accessed February 6, 2021].
- Rainieri S., Barranco A., Primec M., Langerholc T. (2017) Occurrence and toxicity of musks and UV filters in the marine environment. *Food and Chemical Toxicology*, **104**, 57–68.
- Rathod D.M., Patel K.R., Mistri H.N., Jangid A.G., Shrivastav P.S., Sanyal M. (2017) An improved LC-MS/MS method for the quantification of alverine and para hydroxy alverine in human plasma for a bioequivalence study☆. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **7**, 95–102.
- Reiner J.L., Kannan K. (2011) Polycyclic musks in water, sediment, and fishes from the upper Hudson River, New York, USA. *Water, Air, and Soil Pollution*, **214**, 335–342.
- Roberts J., Kumar A., Du J., Hepplewhite C., Ellis D.J., Christy A.G., Beavis S.G. (2016) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia’s largest inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and low flow. *Science of the Total Environment*, **541**, 1625–1637.

- Salthammer T. (2020) Emerging indoor pollutants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **224**, 113423.
- Sandahl J.F., Jenkins J.J. (2002) Pacific steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to chlorpyrifos: Benchmark concentration estimates for acetylcholinesterase inhibition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 2452–2458. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.5620211126> [Accessed December 27, 2020].
- Sauvé S., Desrosiers M. (2014) A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, **8**, 15. Available at: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-153X-8-15> [Accessed March 16, 2020].
- Schreurs R.H.M.M., Legler J., Artola-Garicano E., Sinnige T.L., Lanser P.H., Seinen W., van der Burg B. (2004) In Vitro and in Vivo Antiestrogenic Effects of Polycyclic Musks in Zebrafish. *Environmental Science and Technology*, **38**, 997–1002.
- Schreurs R.H.M.M., Quaedackers M.E., Seinen W., van der Burg B. (2002) Transcriptional activation of estrogen receptor ER $\alpha$  and ER $\beta$  by polycyclic musks is cell type dependent. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **183**, 1–9.
- Sfriso A.A., Chiesa S., Sfriso A., Buosi A., Gobbo L., Boscolo Gnolo A., Argese E. (2018) Spatial distribution, bioaccumulation profiles and risk for consumption of edible bivalves: a comparison among razor clam, Manila clam and cockles in the Venice Lagoon. *Science of the Total Environment*, **643**, 579–591.
- Sheehan D., McDonagh B. (2008) *Oxidative stress and bivalves: a proteomic approach*. Available at: <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/165> [Accessed December 26, 2020].
- Simmons D.B.D., Marlatt V.L., Trudeau V.L., Sherry J.P., Metcalfe C.D. (2010) Interaction of Galaxolide® with the human and trout estrogen receptor- $\alpha$ . *Science of the Total Environment*, **408**, 6158–6164.
- SIVeMP (2020) Chioggia, focolaio in Geriatria. Contagiati anziani e operatori sanitari. Gli ospedali si riorganizzano per affrontare il picco del virus – Sivemp Veneto. Available at: <https://www.sivempveneto.it/chioggia-focolaio-in-geriatria-contagiati-anziani-e-operatori-sanitari-gli-ospedali-si-riorganizzano-per-affrontare-il-picco-del-virus/> [Accessed February 6, 2021].

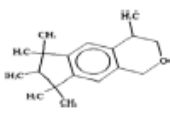
- Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, **175**, 408–413.
- Sommerfreund J.K., Gandhi N., Diamond M.L., Mugnai C., Frignani M., Capodaglio G., Gerino M., Bellucci L.G., Giuliani S. (2010) Contaminant fate and transport in the Venice Lagoon: Results from a multi-segment multimedia model. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**, 222–230.
- Sumner N.R., Guitart C., Fuentes G., Readman J.W. (2010) Inputs and distributions of synthetic musk fragrances in an estuarine and coastal environment; a case study. *Environmental Pollution*, **158**, 215–222.
- Sun Q., Lv M., Li M., Yu C.P. (2015) Personal care products in the aquatic environment in china. *Handbook of Environmental Chemistry*, **36**, 73–94.
- Ternes T.A., Joss A., Siegrist H. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, **38**.
- Trombini C., Hampel M., Blasco J. (2019) Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: An integrative and multibiomarker approach. *Aquatic Toxicology*, **208**, 146–156.
- Tumová J., Šauer P., Golovko O., Koba Učun O., Grabic R., Máchová J., Kocour Kroupová H. (2019) Effect of polycyclic musk compounds on aquatic organisms: A critical literature review supplemented by own data. *Science of the Total Environment*, **651**, 2235–2246.
- US-EPA (2006) High Production Volume (HPV) Chemical List Database. *US Environmental Protection Agency, Washington D.C.*
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M. (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **64**, 178–189. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16406578/> [Accessed December 26, 2020].
- Vallecillos L., Borrull F., Pocurull E. (2014) On-line coupling of solid-phase extraction to gas chromatography-mass spectrometry to determine musk fragrances in wastewater. *Journal of Chromatography A*, **1364**, 1–11.
- Vallecillos L., Borrull F., Pocurull E. (2015) Recent approaches for the determination of synthetic musk fragrances in environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **72**, 80–92.

- Villa S., Assi L., Ippolito A., Bonfanti P., Finizio A. (2012) First evidences of the occurrence of polycyclic synthetic musk fragrances in surface water systems in Italy: Spatial and temporal trends in the Molgora River (Lombardia Region, Northern Italy). *Science of the Total Environment*, **416**, 137–141.
- Villa S., Vighi M., Finizio A. (2014) Theoretical and experimental evidences of medium range atmospheric transport processes of polycyclic musk fragrances. *Science of the Total Environment*, **481**, 27–34.
- Wang X., Liu Z., Wang W., Zhang C., Chen L. (2015) Derivation of predicted no effect concentration (PNEC) for HHCB to terrestrial species (plants and invertebrates). *Science of the Total Environment*, **508**, 122–127.
- Wollenberger L., Breitholtz M., Kusk K.O., Bengtsson B.E. (2003) Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Science of the Total Environment*, **305**, 53–64.
- Yamauchi R., Ishibashi H., Hirano M., Mori T., Kim J.W., Arizono K. (2008) Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the livers of male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, **90**, 261–268.
- Yin J., Wang H., Zhang J., Zhou N., Gao F., Wu Y., Xiang J., Shao B. (2012) The occurrence of synthetic musks in human breast milk in Sichuan, China. *Chemosphere*, **87**, 1018–1023. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196088> [Accessed March 25, 2020].
- Yu Y., Wu L., Chang A.C. (2013) Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, **442**, 310–316.
- Zhang L., An J., Zhou Q. (2012) Single and joint effects of HHCB and cadmium on zebrafish (*Danio rerio*) in feculent water containing bedloads. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*, **6**, 360–372. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11783-011-0353-z> [Accessed January 10, 2021].

## APPENDICE A

**Tabella A1.1**

Caratteristiche di nomenclatura e di struttura del galaxolide. Modificato da Tumová et al. (2019).

| Musk   | Abbreviation | Derivative | Commonly used chemical name  | Chemical (IUPAC) name   | CAS number              | EC number | Molecular formula                 | Structure   |
|--|--------------|------------|--|---|-------------------------|-----------|-----------------------------------|---|
| Galaxolide<br>(Abbalide;<br>Pearlide;<br>Chromanolide) | HHCB         | Isochroman | 1,3,4,6,7,8-Hexahydro-<br>4,6,6,7,8,8-<br>hexamethyl-cyclopenta[g]<br>benzopyran | 4,6,6,7,8,8-Hexamethyl-1,3,4,7-<br>tetrahydrocyclopenta[g]<br>isochromene | 1222-05-5;<br>214-946-9 | 214-946-9 | C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O |  |

**Tabella A1.2**

Proprietà chimico-fisiche del galaxolide e di altri rappresentanti della famiglia dei polycyclic musks. Modificato da Tumová et al. (2019).

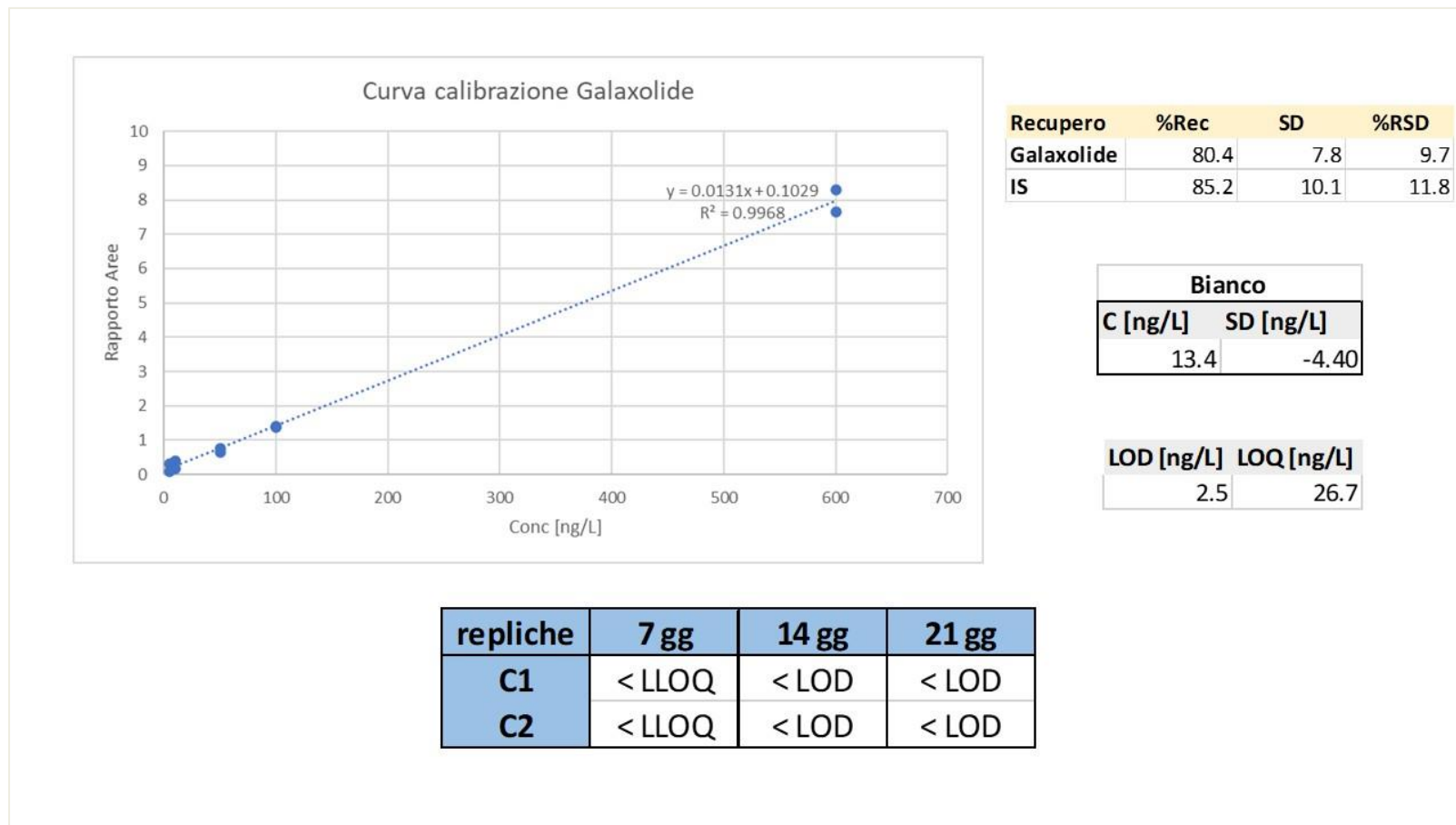
| Trade name   | Molecular weight<br>(g·mol <sup>-1</sup> ) | Log Kow          | Log Kaw <sup>c</sup> | BCF<br>(L·kg <sup>-1</sup><br>WW) <sup>a</sup> | Water solubility (mg·L <sup>-1</sup> )<br>at 25 °C | Henry's LC<br>(Pa·m <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ) | Vapour pressure (Pa) <sup>b</sup><br>at 25 °C |
|--|--|------------------|----------------------|--|--|---|---|
| Galaxolide (Abbalide; Pearlide; Chromanolide)                      | 258.41                                     | 5.9 <sup>b</sup> | -2.57                | 3629   | 1.75 <sup>b</sup>                                  | 11.3 <sup>b</sup>                                     | 0.0727  |
| Tonalide (Fixolide; Tetralide; Musk Plus;<br>Tentarome; Astralide) | 258.41                                     | 5.7 <sup>b</sup> | -3.28                | 696  | 1.25 <sup>b</sup>                                  | 12.5 <sup>b</sup>                                     | 0.0682  |
| Celestolide (Crysolide)  | 244.38                                     | 5.9 <sup>a</sup> | -3.22                | 984  | 0.22 <sup>a</sup>                                  | 3.2 <sup>a</sup>                                      | 0.0192  |
| Phantolide   | 244.38                                     | 5.9 <sup>a</sup> | -3.27                | 880  | 0.25 <sup>a</sup>                                  | 3.2 <sup>a</sup>                                      | 0.0196  |
| Traseolide   | 258.41                                     | 6.3 <sup>a</sup> | -3.30                | 1757   | 0.09 <sup>a</sup>                                  | 4.3 <sup>a</sup>                                      | 0.0091  |

Abbreviations: Kow – octanol/water partition coefficient, Kaw – air/water partition coefficient, BCF – bioconcentration factor (whole fish homogenate), Henry's LC – Henry's law constants, WW – wet weight.

<sup>a</sup> Values estimated using USEPA's program EPI Suite™ by the bond contribution method (USEPA, 2010).

<sup>b</sup> Estimated or calculated values by Balk and Ford (1999a).

<sup>c</sup> Zhang et al. (2010), mean values calculated from predicted data using EPI SUITE™, COSMOtherm, SPARC and ABSOLV provided in the study.



**Figura A1.3** - Dettagli del metodo utilizzato per la determinazione del galaxolide nei campioni di acqua di mare al GC-MS: curva di calibrazione del metodo ottenuta da analisi di soluzioni standard a concentrazione nota ( $n=2$ ), percentuali determinate di recupero (%Rec) del galaxolide e dell'IS, concentrazione teorica del bianco del metodo (valore di fondo del laboratorio) e valori di LOD e LLOQ. In basso sono riportati i valori determinati per i campioni analizzati, costituiti da due repliche per giorno di campionamento (a 7, 14 e 21 giorni). SD: deviazione standard; %RSD: deviazione standard percentuale; C: concentrazione; LOD: limit of detection; LLOQ: lower limit of quantification.

## APPENDICE B

**Tabella A2.1** - ANOVA a due vie per il diametro cellulare. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS      | GdL | MS      | F       | p        |
|-------------------|---------|-----|---------|---------|----------|
| Intercept         | 0.0336  | 1   | 0.0336  | 87.2673 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.00083 | 2   | 0.00041 | 1.0737  | 0.350346 |
| Trattamento       | 0.00061 | 2   | 0.00030 | 0.7883  | 0.460812 |
| Tempo*Trattamento | 0.00221 | 4   | 0.00055 | 1.4368  | 0.237404 |
| Error             | 0.01733 | 45  | 0.00039 |         |          |

**Tabella A2.3** - ANOVA a due vie per l'LDH. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS      | GdL | MS      | F        | p        |
|-------------------|---------|-----|---------|----------|----------|
| Intercept         | 0.2761  | 1   | 0.2761  | 904.8010 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.00072 | 2   | 0.00036 | 1.1741   | 0.318390 |
| Trattamento       | 0.00033 | 2   | 0.00017 | 0.5443   | 0.584047 |
| Tempo*Trattamento | 0.00166 | 4   | 0.00041 | 1.3578   | 0.263613 |
| Error             | 0.01373 | 45  | 0.00031 |          |          |

**Tabella A2.5** - ANOVA a due vie per la CAT nella branchia. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS      | GdL | MS      | F       | p        |
|-------------------|---------|-----|---------|---------|----------|
| Intercept         | 5160026 | 1   | 5160026 | 1057.34 | 0.000000 |
| Tempo             | 351870  | 2   | 175935  | 36.05   | 0.000000 |
| Trattamento       | 8093    | 2   | 4046    | 0.83    | 0.442971 |
| Tempo*Trattamento | 43468   | 4   | 10867   | 2.23    | 0.081094 |
| Error             | 219609  | 45  | 4880    |         |          |

**Tabella A2.2** - ANOVA a due vie per il volume cellulare. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS       | GdL | MS       | F        | p        |
|-------------------|----------|-----|----------|----------|----------|
| Intercept         | 703.3075 | 1   | 703.3075 | 944.5023 | 0.000000 |
| Tempo             | 4.67877  | 2   | 2.33939  | 3.1417   | 0.052822 |
| Trattamento       | 0.08231  | 2   | 0.04115  | 0.0553   | 0.946296 |
| Tempo*Trattamento | 1.03815  | 4   | 0.25954  | 0.3485   | 0.843653 |
| Error             | 33.50848 | 45  | 0.74463  |          |          |

**Tabella A2.4** - ANOVA a due vie per la SOD nella ghiandola. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS    | GdL | MS    | F       | p        |
|-------------------|-------|-----|-------|---------|----------|
| Intercept         | 67.92 | 1   | 67.92 | 1606.66 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.27  | 2   | 0.14  | 3.2045  | 0.049990 |
| Trattamento       | 0.04  | 2   | 0.02  | 0.5091  | 0.604472 |
| Tempo*Trattamento | 0.41  | 4   | 0.10  | 2.3958  | 0.064285 |
| Error             | 1.90  | 45  | 0.04  |         |          |

**Tabella A2.6** - ANOVA a due vie per la GST nella ghiandola. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS       | GdL | MS       | F      | p        |
|-------------------|----------|-----|----------|--------|----------|
| Intercept         | 16117329 | 1   | 16117329 | 781.88 | 0.000000 |
| Tempo             | 3123329  | 2   | 1561665  | 7.58   | 0.001459 |
| Trattamento       | 1022807  | 2   | 511403   | 2.48   | 0.095043 |
| Tempo*Trattamento | 1808853  | 4   | 452213   | 2.19   | 0.084854 |
| Error             | 9276082  | 45  | 206135   |        |          |



**Tabella A2.7** - ANOVA a due vie per la GR nella branchia. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS      | GdL | MS      | F       | p        |
|-------------------|---------|-----|---------|---------|----------|
| Intercept         | 45.9265 | 1   | 45.9265 | 2739.19 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.0576  | 2   | 0.0288  | 1.72    | 0.191282 |
| Trattamento       | 0.0234  | 2   | 0.0117  | 0.70    | 0.502915 |
| Tempo*Trattamento | 0.0561  | 4   | 0.0140  | 0.84    | 0.509298 |
| Error             | 0.7545  | 45  | 0.0168  |         |          |

**Tabella A2.9** - ANOVA a due vie per la PCC nella branchia. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS     | GdL | MS     | F      | p        |
|-------------------|--------|-----|--------|--------|----------|
| Intercept         | 4.6382 | 1   | 4.6382 | 224.85 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.0138 | 2   | 0.0069 | 0.33   | 0.718209 |
| Trattamento       | 0.0424 | 2   | 0.0212 | 1.03   | 0.366248 |
| Tempo*Trattamento | 0.0904 | 4   | 0.0226 | 1.10   | 0.370475 |
| Error             | 0.9282 | 45  | 0.0206 |        |          |

**Tabella A2.8** - ANOVA a due vie per la GR nella ghiandola. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS      | GdL | MS      | F       | p        |
|-------------------|---------|-----|---------|---------|----------|
| Intercept         | 41.1070 | 1   | 41.1070 | 2627.53 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.0808  | 2   | 0.0404  | 2.58    | 0.086878 |
| Trattamento       | 0.0824  | 2   | 0.0412  | 2.63    | 0.082916 |
| Tempo*Trattamento | 0.1487  | 4   | 0.0372  | 2.38    | 0.066047 |
| Error             | 0.7040  | 45  | 0.0156  |         |          |

**Tabella A2.10** - ANOVA a due vie per la PCC nella ghiandola. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS     | GdL | MS     | F      | p        |
|-------------------|--------|-----|--------|--------|----------|
| Intercept         | 3.5911 | 1   | 3.5911 | 241.26 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.0046 | 2   | 0.0023 | 0.16   | 0.856150 |
| Trattamento       | 0.0252 | 2   | 0.0126 | 0.85   | 0.436077 |
| Tempo*Trattamento | 0.0658 | 4   | 0.0164 | 1.11   | 0.365883 |
| Error             | 0.6698 | 45  | 0.0149 |        |          |

**Tabella A2.11** - ANOVA a due vie per il THC. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS       | GdL | MS       | F        | p        |
|-------------------|----------|-----|----------|----------|----------|
| Intercept         | 151.8903 | 1   | 151.8903 | 908.7013 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.92962  | 2   | 0.46481  | 2.7808   | 0.072664 |
| Trattamento       | 1.18928  | 2   | 0.59464  | 3.5575   | 0.036781 |
| Tempo*Trattamento | 1.31766  | 4   | 0.32941  | 1.9708   | 0.115226 |
| Error             | 7.52179  | 45  | 0.16715  |          |          |

**Tabella A2.12** - Risultati del confronto a coppie (HSD di Tukey) per il THC in *R. philippinarum*. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Cell No. | Tempo | Conc | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      |
|----------|-------|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1        | 1     | 1    |          | 0.064703 | 0.344834 | 0.762286 | 0.841972 | 0.907772 | 0.019667 | 0.126833 | 0.957666 |
| 2        | 1     | 2    | 0.064703 |          | 0.006602 | 0.033133 | 0.097333 | 0.082293 | 0.601936 | 0.736775 | 0.057781 |
| 3        | 1     | 3    | 0.344834 | 0.006602 |          | 0.518759 | 0.254098 | 0.289793 | 0.001534 | 0.015730 | 0.372221 |
| 4        | 2     | 1    | 0.762286 | 0.033133 | 0.518759 |          | 0.616129 | 0.675886 | 0.009165 | 0.069455 | 0.803002 |
| 5        | 2     | 2    | 0.841972 | 0.097333 | 0.254098 | 0.616129 |          | 0.933410 | 0.031608 | 0.182190 | 0.800724 |
| 6        | 2     | 3    | 0.907772 | 0.082293 | 0.289793 | 0.675886 | 0.933410 |          | 0.025985 | 0.157072 | 0.865863 |
| 7        | 3     | 1    | 0.019667 | 0.601936 | 0.001534 | 0.009165 | 0.031608 | 0.025985 |          | 0.392421 | 0.017266 |
| 8        | 3     | 2    | 0.126833 | 0.736775 | 0.015730 | 0.069455 | 0.182190 | 0.157072 | 0.392421 |          | 0.114637 |
| 9        | 3     | 3    | 0.957666 | 0.057781 | 0.372221 | 0.803002 | 0.800724 | 0.865863 | 0.017266 | 0.114637 |          |

**Tabella A2.13** - ANOVA a due vie per l'XTT. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS       | GdL | MS       | F        | P        |
|-------------------|----------|-----|----------|----------|----------|
| Intercept         | 19.48841 | 1   | 19.48841 | 230.6338 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.24594  | 2   | 0.12297  | 1.4553   | 0.244104 |
| Trattamento       | 1.18916  | 2   | 0.59458  | 7.0365   | 0.002193 |
| Tempo*Trattamento | 0.35728  | 4   | 0.08932  | 1.0570   | 0.388785 |
| Error             | 3.80247  | 45  | 0.08450  |          |          |

**Tabella A2.14** - Risultati del confronto a coppie (HSD di Tukey) per l'XTT in *R. philippinarum*. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Cell No. | Tempo | Conc | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      |
|----------|-------|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1        | 1     | 1    |          | 0.948229 | 0.037155 | 0.881986 | 0.973316 | 0.666058 | 0.118066 | 0.378464 | 0.107707 |
| 2        | 1     | 2    | 0.948229 |          | 0.032009 | 0.933426 | 0.974885 | 0.619710 | 0.133480 | 0.414169 | 0.094790 |
| 3        | 1     | 3    | 0.037155 | 0.032009 |          | 0.026322 | 0.034419 | 0.093534 | 0.000517 | 0.003964 | 0.615011 |
| 4        | 2     | 1    | 0.881986 | 0.933426 | 0.026322 |          | 0.908435 | 0.562323 | 0.155631 | 0.463021 | 0.080086 |
| 5        | 2     | 2    | 0.973316 | 0.974885 | 0.034419 | 0.908435 |          | 0.642002 | 0.125817 | 0.396607 | 0.100883 |
| 6        | 2     | 3    | 0.666058 | 0.619710 | 0.093534 | 0.562323 | 0.642002 |          | 0.048522 | 0.192215 | 0.233785 |
| 7        | 3     | 1    | 0.118066 | 0.133480 | 0.000517 | 0.155631 | 0.125817 | 0.048522 |          | 0.485109 | 0.002285 |
| 8        | 3     | 2    | 0.378464 | 0.414169 | 0.003964 | 0.463021 | 0.396607 | 0.192215 | 0.485109 |          | 0.014946 |
| 9        | 3     | 3    | 0.107707 | 0.094790 | 0.615011 | 0.080086 | 0.100883 | 0.233785 | 0.002285 | 0.014946 |          |

**Tabella A2.15** - ANOVA a due vie per il lisozima. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS       | GdL | MS       | F       | p        |
|-------------------|----------|-----|----------|---------|----------|
| Intercept         | 10058.19 | 1   | 10058.19 | 86.9245 | 0.000000 |
| Tempo             | 136.36   | 2   | 68.18    | 0.5892  | 0.559287 |
| Trattamento       | 872.10   | 2   | 436.05   | 3.7684  | 0.031243 |
| Tempo*Trattamento | 301.40   | 4   | 75.35    | 0.6512  | 0.629242 |
| Error             | 4859.90  | 42  | 115.71   |         |          |

**Tabella A2.16** - Risultati del confronto a coppie (HSD di Tukey) per il lisozima in *R. philippinarum*. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Cell No. | Tempo | Conc | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      |
|----------|-------|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1        | 1     | 1    |          | 1.000000 | 0.984033 | 1.000000 | 0.994783 | 0.999999 | 0.985359 | 0.965595 | 0.928752 |
| 2        | 1     | 2    | 1.000000 |          | 0.980288 | 1.000000 | 0.996083 | 0.999996 | 0.988211 | 0.971069 | 0.918676 |
| 3        | 1     | 3    | 0.984033 | 0.980288 |          | 0.990594 | 0.656422 | 0.998317 | 0.593476 | 0.496731 | 0.999994 |
| 4        | 2     | 1    | 1.000000 | 1.000000 | 0.990594 |          | 0.990534 | 1.000000 | 0.976884 | 0.950236 | 0.948654 |
| 5        | 2     | 2    | 0.994783 | 0.996083 | 0.656422 | 0.990534 |          | 0.967182 | 1.000000 | 0.999995 | 0.491818 |
| 6        | 2     | 3    | 0.999999 | 0.999996 | 0.998317 | 1.000000 | 0.967182 |          | 0.938874 | 0.890744 | 0.981643 |
| 7        | 3     | 1    | 0.985359 | 0.988211 | 0.593476 | 0.976884 | 1.000000 | 0.938874 |          | 1.000000 | 0.437825 |
| 8        | 3     | 2    | 0.965595 | 0.971069 | 0.496731 | 0.950236 | 0.999995 | 0.890744 | 1.000000 |          | 0.353890 |
| 9        | 3     | 3    | 0.928752 | 0.918676 | 0.999994 | 0.948654 | 0.491818 | 0.981643 | 0.437825 | 0.353890 |          |

**Tabella A2.17** - ANOVA a due vie per la SOD nella branchia. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS     | GdL | MS     | F        | p        |
|-------------------|--------|-----|--------|----------|----------|
| Intercept         | 105.16 | 1   | 105.16 | 772.8127 | 0.000000 |
| Tempo             | 9.86   | 2   | 4.93   | 36.2234  | 0.000000 |
| Trattamento       | 0.32   | 2   | 0.16   | 1.1811   | 0.316285 |
| Tempo*Trattamento | 6.33   | 4   | 1.58   | 11.6229  | 0.000001 |
| Error             | 6.12   | 45  | 0.14   |          |          |

**Tabella A2.18** - Risultati del confronto a coppie (HSD di Tukey) per la SOD nella branchia di *R. philippinarum*. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Cell No. | Tempo | Conc | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      |
|----------|-------|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1        | 1     | 1    |          | 0.530891 | 0.005798 | 0.429399 | 0.432486 | 0.123792 | 0.002498 | 0.002203 | 0.084704 |
| 2        | 1     | 2    | 0.530891 |          | 0.540510 | 1.000000 | 0.003550 | 0.000524 | 0.360608 | 0.336351 | 0.983236 |
| 3        | 1     | 3    | 0.005798 | 0.540510 |          | 0.644737 | 0.000145 | 0.000143 | 0.999998 | 0.999995 | 0.983097 |
| 4        | 2     | 1    | 0.429399 | 1.000000 | 0.644737 |          | 0.002236 | 0.000364 | 0.456336 | 0.429255 | 0.994529 |
| 5        | 2     | 2    | 0.432486 | 0.003550 | 0.000145 | 0.002236 |          | 0.998789 | 0.000143 | 0.000143 | 0.000271 |
| 6        | 2     | 3    | 0.123792 | 0.000524 | 0.000143 | 0.000364 | 0.998789 |          | 0.000143 | 0.000143 | 0.000153 |
| 7        | 3     | 1    | 0.002498 | 0.360608 | 0.999998 | 0.456336 | 0.000143 | 0.000143 |          | 1.000000 | 0.926832 |
| 8        | 3     | 2    | 0.002203 | 0.336351 | 0.999995 | 0.429255 | 0.000143 | 0.000143 | 1.000000 |          | 0.913073 |
| 9        | 3     | 3    | 0.084704 | 0.983236 | 0.983097 | 0.994529 | 0.000271 | 0.000153 | 0.926832 | 0.913073 |          |

**Tabella A2.19** - ANOVA a due vie per la CAT nella ghiandola. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS      | GdL | MS      | F       | p        |
|-------------------|---------|-----|---------|---------|----------|
| Intercept         | 3601306 | 1   | 3601306 | 1669.95 | 0.000000 |
| Tempo             | 39521   | 2   | 19760   | 9.16    | 0.000459 |
| Trattamento       | 200     | 2   | 100     | 0.05    | 0.954656 |
| Tempo*Trattamento | 47216   | 4   | 11804   | 5.47    | 0.001118 |
| Error             | 97044   | 45  | 2157    |         |          |

**Tabella A2.20** - Risultati del confronto a coppie (HSD di Tukey) per la CAT nella ghiandola di *R. philippinarum*. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Cell No. | Tempo | Conc | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      |
|----------|-------|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1        | 1     | 1    |          | 0.026693 | 0.173879 | 0.011147 | 0.329703 | 0.090717 | 0.000152 | 0.026840 | 0.004360 |
| 2        | 1     | 2    | 0.026693 |          | 0.996587 | 0.999996 | 0.964508 | 0.999897 | 0.291779 | 1.000000 | 0.999242 |
| 3        | 1     | 3    | 0.173879 | 0.996587 |          | 0.969567 | 0.999993 | 0.999998 | 0.054077 | 0.996648 | 0.877244 |
| 4        | 2     | 1    | 0.011147 | 0.999996 | 0.969567 |          | 0.868134 | 0.996010 | 0.476465 | 0.999996 | 0.999996 |
| 5        | 2     | 2    | 0.329703 | 0.964508 | 0.999993 | 0.868134 |          | 0.999209 | 0.022002 | 0.964883 | 0.691502 |
| 6        | 2     | 3    | 0.090717 | 0.999897 | 0.999998 | 0.996010 | 0.999209 |          | 0.109632 | 0.999900 | 0.965191 |
| 7        | 3     | 1    | 0.000152 | 0.291779 | 0.054077 | 0.476465 | 0.022002 | 0.109632 |          | 0.290734 | 0.688785 |
| 8        | 3     | 2    | 0.026840 | 1.000000 | 0.996648 | 0.999996 | 0.964883 | 0.999900 | 0.290734 |          | 0.999224 |
| 9        | 3     | 3    | 0.004360 | 0.999242 | 0.877244 | 0.999996 | 0.691502 | 0.965191 | 0.688785 | 0.999224 |          |

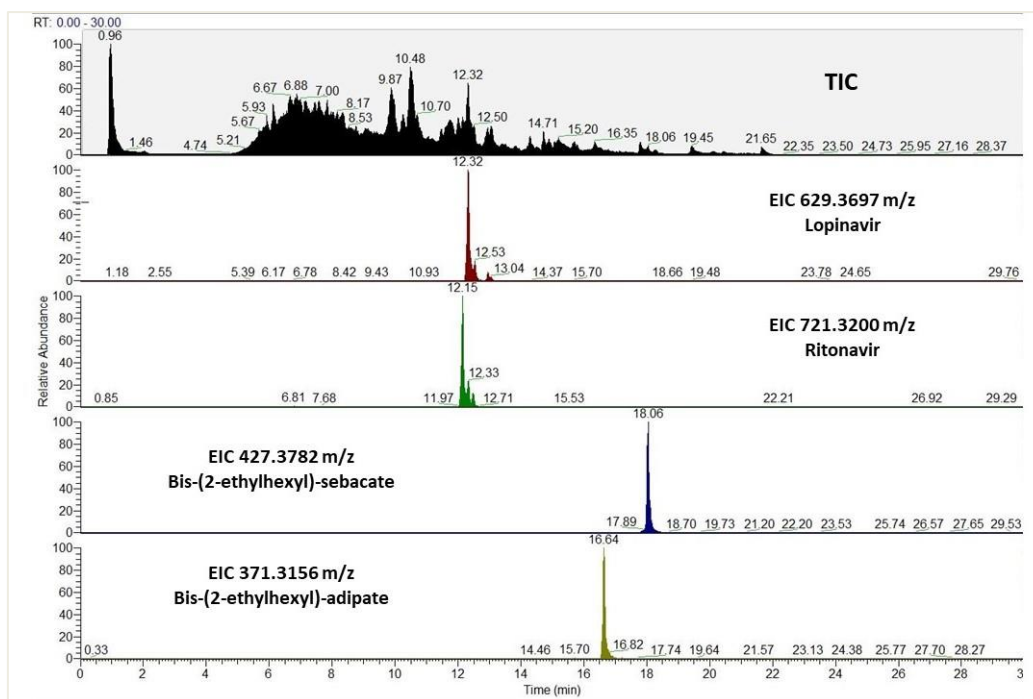
**Tabella A2.21** - ANOVA a due vie per l'AcH nella branchia. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Effect            | SS     | GdL | MS     | F      | p        |
|-------------------|--------|-----|--------|--------|----------|
| Intercept         | 9.8498 | 1   | 9.8498 | 764.00 | 0.000000 |
| Tempo             | 0.3746 | 2   | 0.1873 | 14.53  | 0.000014 |
| Trattamento       | 0.3431 | 2   | 0.1716 | 13.31  | 0.000029 |
| Tempo*Trattamento | 0.0838 | 4   | 0.0210 | 1.63   | 0.184438 |
| Error             | 0.5802 | 45  | 0.0129 |        |          |

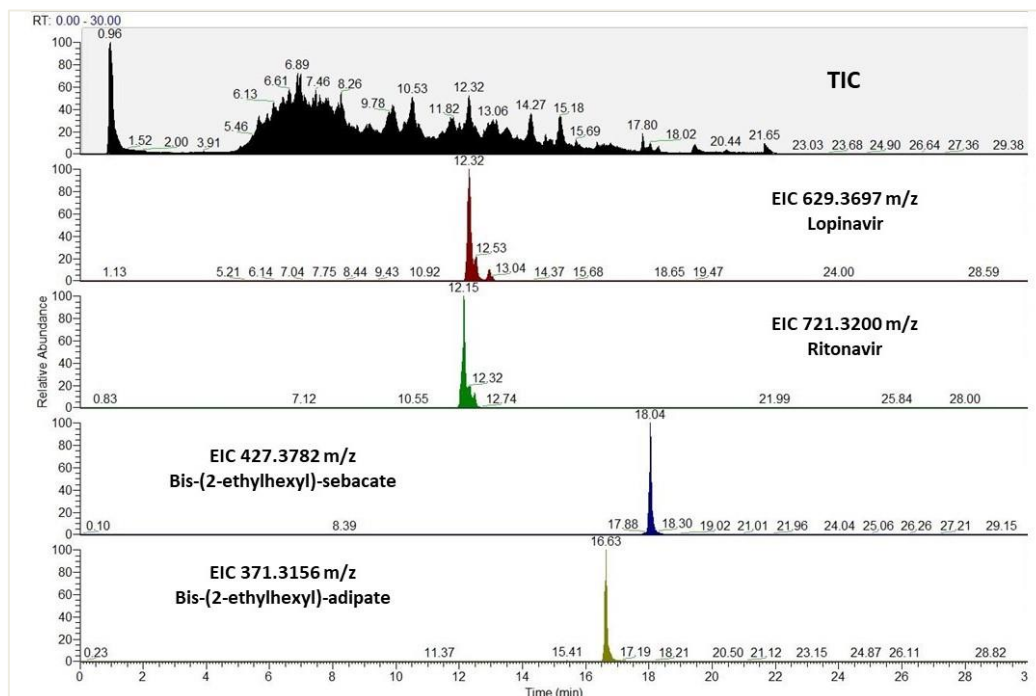
**Tabella A2.22** - Risultati del confronto a coppie (HSD di Tukey) per l'AcH nella branchia di *R. philippinarum*. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

| Cell No. | Tempo | Conc | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      |
|----------|-------|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1        | 1     | 1    |          | 0.592436 | 0.981603 | 0.217962 | 0.000143 | 0.360468 | 0.100694 | 0.000479 | 0.215364 |
| 2        | 1     | 2    | 0.592436 |          | 0.990983 | 0.999138 | 0.000985 | 0.999989 | 0.981278 | 0.092142 | 0.999055 |
| 3        | 1     | 3    | 0.981603 | 0.990983 |          | 0.814983 | 0.000178 | 0.931206 | 0.590534 | 0.008451 | 0.811738 |
| 4        | 2     | 1    | 0.217962 | 0.999138 | 0.814983 |          | 0.006603 | 0.999998 | 0.999988 | 0.337691 | 1.000000 |
| 5        | 2     | 2    | 0.000143 | 0.000985 | 0.000178 | 0.006603 |          | 0.002853 | 0.018717 | 0.768537 | 0.006724 |
| 6        | 2     | 3    | 0.360468 | 0.999989 | 0.931206 | 0.999998 | 0.002853 |          | 0.999111 | 0.201523 | 0.999998 |
| 7        | 3     | 1    | 0.100694 | 0.981278 | 0.590534 | 0.999988 | 0.018717 | 0.999111 |          | 0.566740 | 0.999990 |
| 8        | 3     | 2    | 0.000479 | 0.092142 | 0.008451 | 0.337691 | 0.768537 | 0.201523 | 0.566740 |          | 0.341157 |
| 9        | 3     | 3    | 0.215364 | 0.999055 | 0.811738 | 1.000000 | 0.006724 | 0.999998 | 0.999990 | 0.341157 |          |

## APPENDICE C

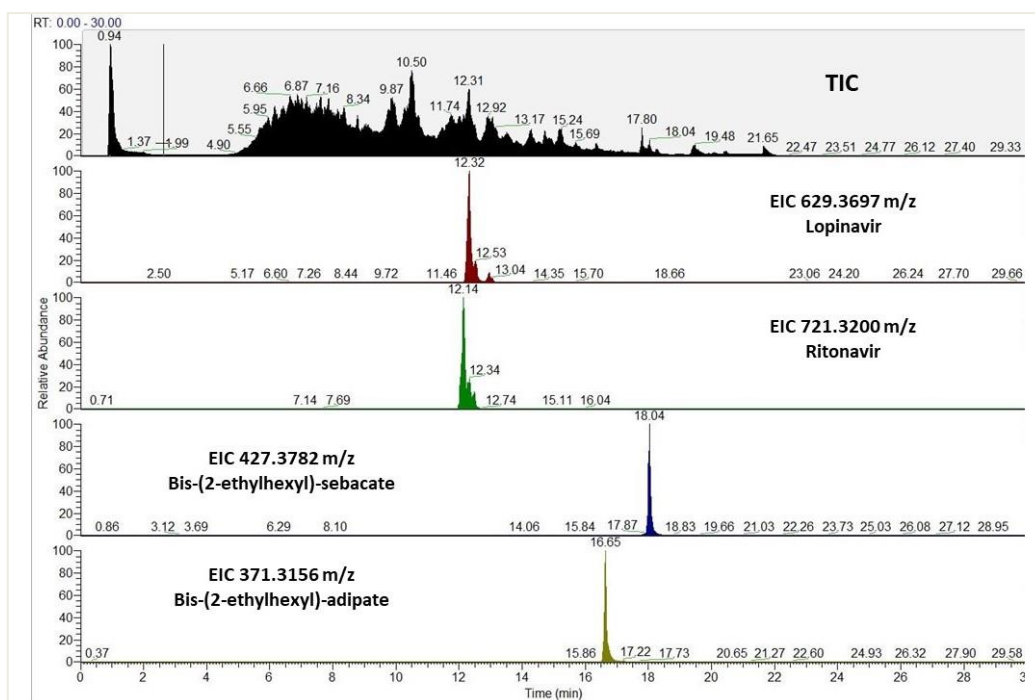


**Figura A3.1** - Cromatogramma TIC (in alto) ed EIC degli  $m/z$  degli ioni molecolari  $[M-H]^+$  per i diversi composti considerati (Lopinavir, Ritonavir, di-(2-etilesil)-sebacato e di-(2-etilesil)-adipato), per il campione Pool1. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo dell'analisi, mentre sulle ordinate l'abbondanza relativa.

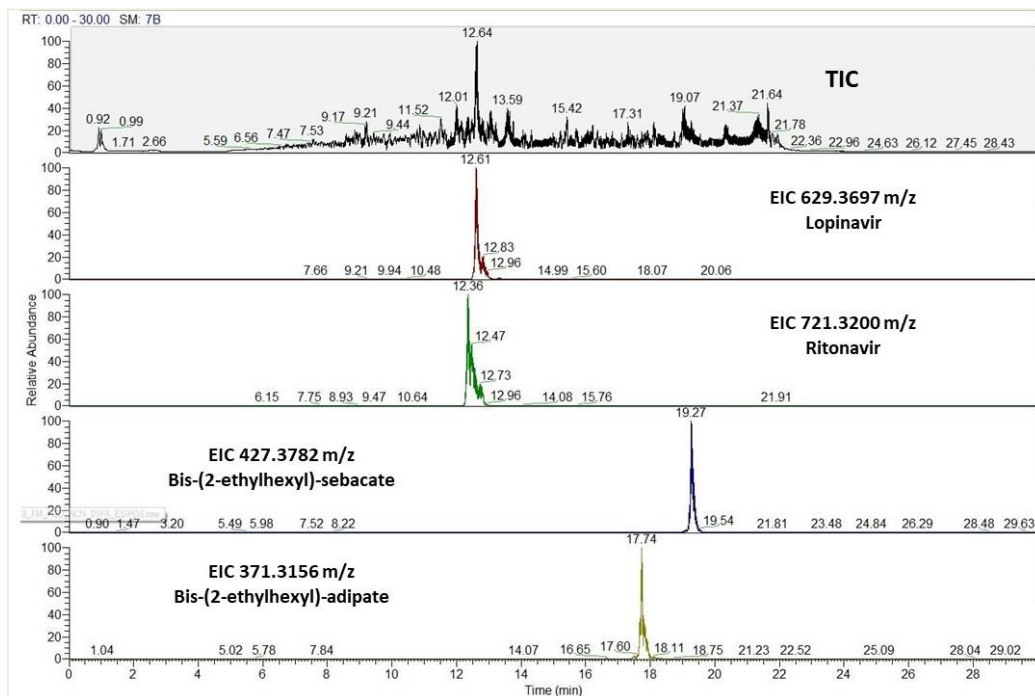


**Figura A3.2** - Cromatogramma TIC (in alto) ed EIC degli  $m/z$  degli ioni molecolari  $[M-H]^+$  per i diversi composti considerati (Lopinavir, Ritonavir, di-(2-etilesil)-sebacato e di-(2-etilesil)-adipato), per il campione Pool2. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo dell'analisi, mentre sulle ordinate l'abbondanza relativa.

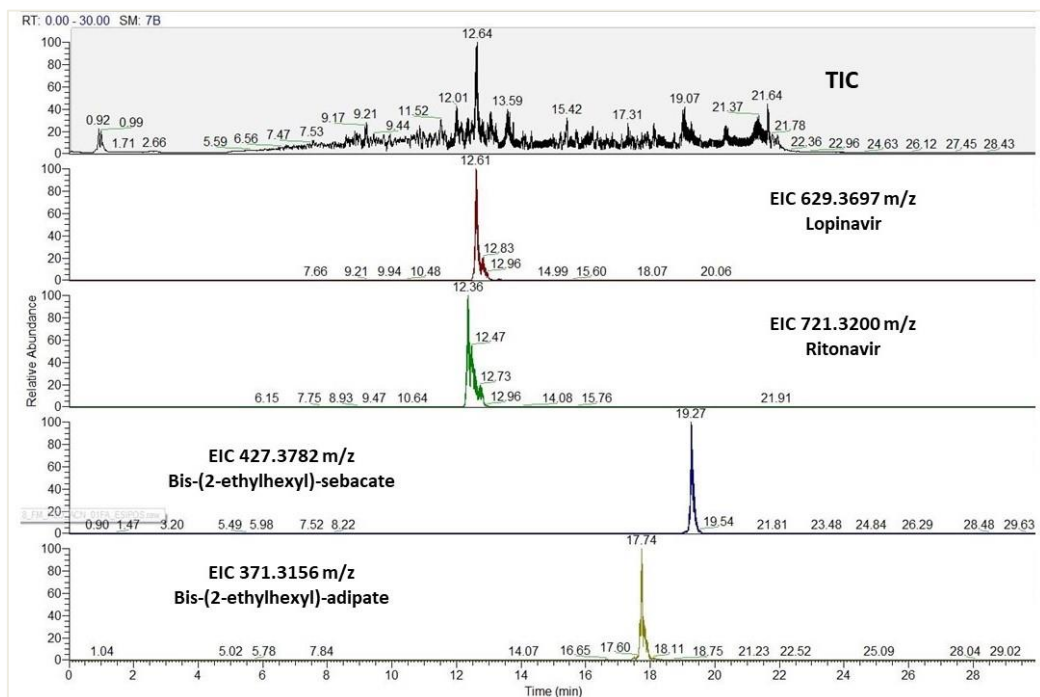




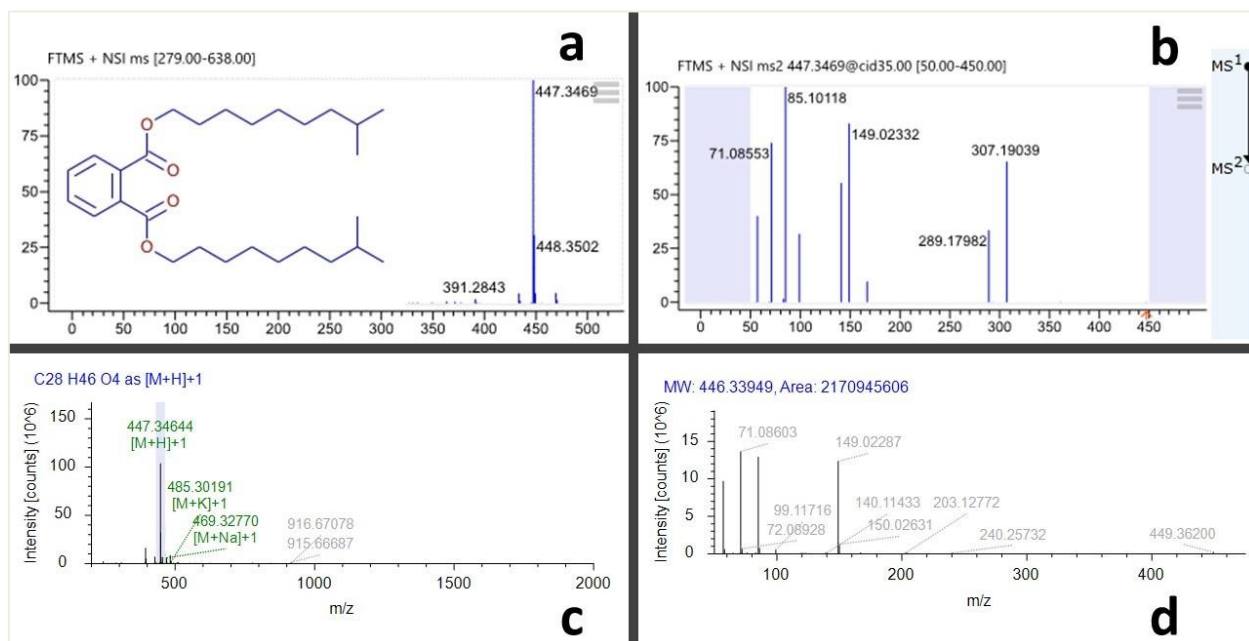
**Figura A3.3** - Cromatogramma TIC (in alto) ed EIC degli  $m/z$  degli ioni molecolari  $[M-H]^+$  per i diversi composti considerati (Lopinavir, Ritonavir, di-(2-etilesil)-sebacato e di-(2-etilesil)-adipato), per il campione Pool3. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo dell'analisi, mentre sulle ordinate l'abbondanza relativa.



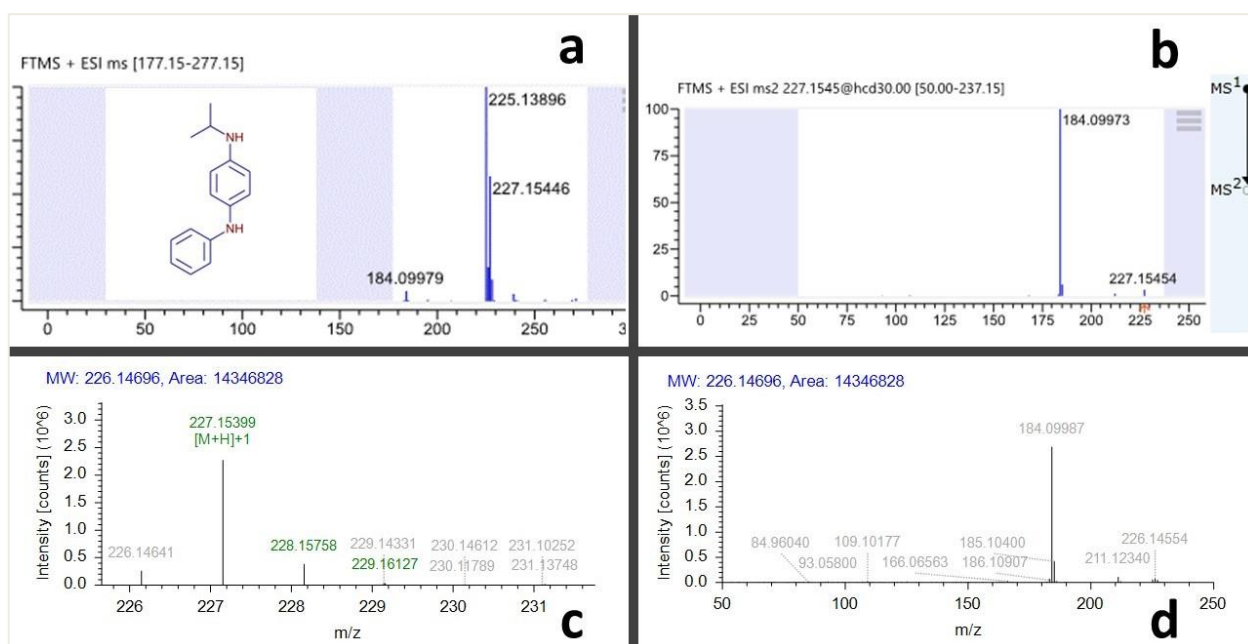
**Figura A3.4** - Cromatogramma TIC (in alto) ed EIC degli  $m/z$  degli ioni molecolari  $[M-H]^+$  per i diversi composti considerati (Lopinavir, Ritonavir, di-(2-etilesil)-sebacato e di-(2-etilesil)-adipato) del campione W1. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo dell'analisi, mentre sulle ordinate l'abbondanza relativa.



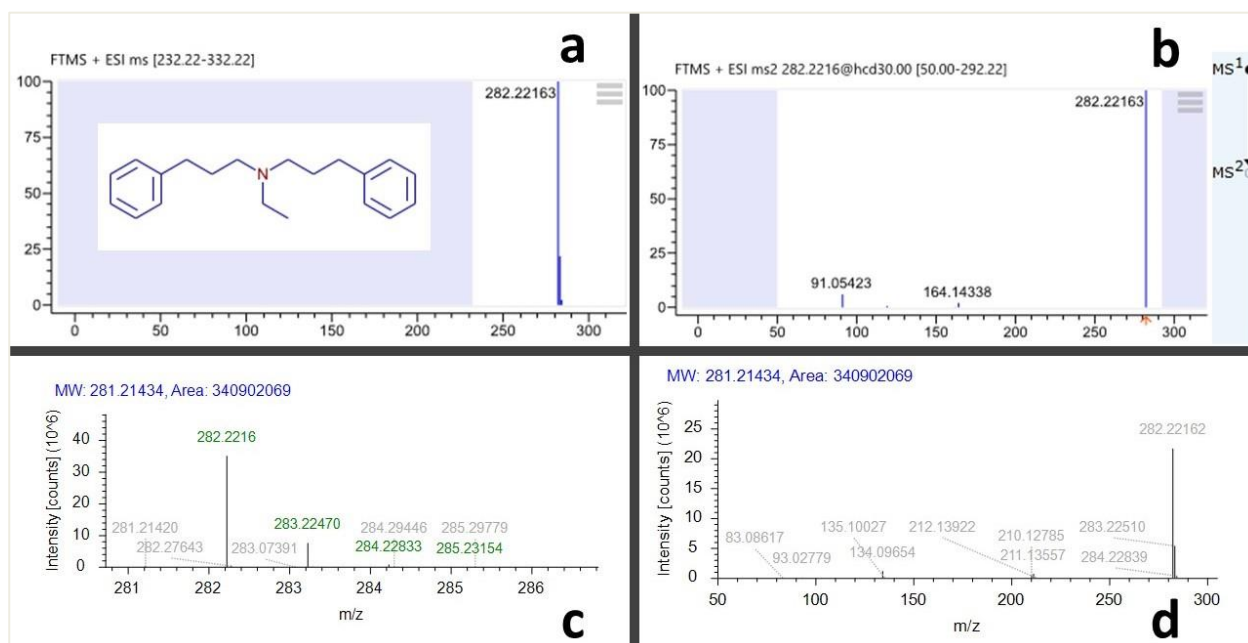
**Figura A3.5** - Cromatogramma TIC (in alto) ed EIC degli  $m/z$  degli ioni molecolari  $[M-H]^+$  per i diversi composti considerati (Lopinavir, Ritonavir, di-(2-etilesil)-sebacato e di-(2-etilesil)-adipato) del campione W2. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo dell'analisi, mentre sulle ordinate l'abbondanza relativa.



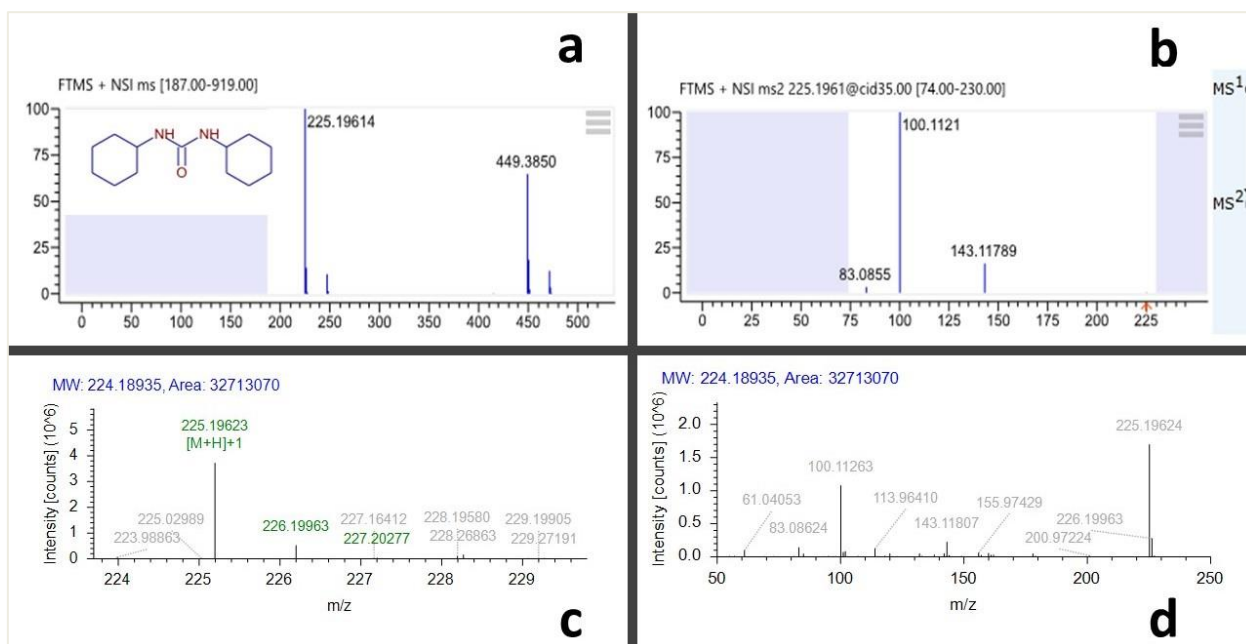
**Figura A3.6** - Confronto degli spettri MS e MS/MS di diisodecil-ftalato (DIDP) tra il database mzCloud (sopra) e il campione W1 (sotto). In ordine: (a) struttura molecolare del DIDP e suo spettro MS secondo mzCloud; (b) spettro MS/MS a 30 eV secondo mzCloud; (c) spettro MS ottenuto per il campione W1; (d) spettro MS/MS ottenuto per il campione W1 a 35 eV.



**Figura A3.7** - Confronto degli spettri MS e MS/MS di N-isopropil-N'-fenil-p-fenilendiammina (IPPD) tra il database mzCloud (sopra) e il campione W1 (sotto). In ordine: (a) struttura molecolare della IPPD e suo spettro MS secondo mzCloud; (b) spettro MS/MS a 35 eV secondo mzCloud; (c) spettro MS ottenuto per il campione W1; (d) spettro MS/MS ottenuto per il campione W1 a 35 eV.



**Figura A3.8** - Confronto degli spettri MS e MS/MS di Alverina tra il database mzCloud (sopra) e il campione W1 (sotto). In ordine: (a) struttura molecolare dell'Alverina e suo spettro MS secondo mzCloud; (b) spettro MS/MS a 30 eV secondo mzCloud; (c) spettro MS ottenuto per il campione W1; (d) spettro MS/MS ottenuto per il campione W1 a 35 eV.



**Figura A3.9** - Confronto degli spettri MS e MS/MS di N,N'-dicicloesilurea tra il database mzCloud (sopra) e il campione W1 (sotto). In ordine: (a) struttura molecolare della N,N'-dicicloesilurea e suo spettro MS secondo mzCloud; (b) spettro MS/MS a 35 eV secondo mzCloud; (c) spettro MS ottenuto per il campione W1; (d) spettro MS/MS ottenuto per il campione W1 a 35 eV.