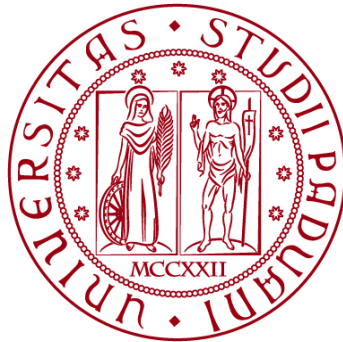


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Scienze Naturali



ELABORATO DI LAUREA

Biomarker di stress ossidativo in granchi (*Carcinus aestuarii*) alimentati con vongole (*Ruditapes philippinarum*) esposte ad analoghi del Bisfenolo A

Tutor: Prof. Valerio Matozzo

Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott. Jacopo Fabrello

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Elisabetta Tarussio

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Bisfenoli.....	1
1.1.1 Produzione e usi.....	2
1.1.2 Livelli ambientali	3
2. SCOPO DELLA TESI.....	5
3. MATERIALI E METODI.....	6
3.1 Acclimatazione ed esposizione delle vongole.....	6
3.2 Stabulazione e alimentazione dei granchi con vongole contaminate.....	6
3.3 GPX.....	7
3.4 GR	7
3.5 GST.....	8
3.6 Enzimi amilolitici.....	8
3.7 ETS	8
3.8 Proteine totali.....	9
3.9 Analisi statistica	9
4. RISULTATI.....	10
5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	18
LETTERATURA CITATA	21

1. INTRODUZIONE

1.1 Bisfenoli

I bisfenoli (Bps) sono un gruppo di composti chimici organici ottenuti dalla condensazione di due molecole di fenolo con una di aldeide o chetone (Baralla *et al.*, 2021). A oggi sono stati sintetizzati almeno 148 bisfenoli, che possono essere suddivisi in due gruppi principali: un primo gruppo in cui sono inclusi 17 bisfenoli che presentano una struttura chimica semplice composta da due anelli fenolici e diversi gruppi funzionali e un secondo gruppo che include tutti i composti derivati dal primo. Il gruppo chimico tra i due idrossifenili, oltre che la presenza di gruppi chimici aggiuntivi come bromurati e clorurati, determina la diversa natura chimica di questi composti (Fabrello e Matozzo, 2022). Tra questi il Bisfenolo A (Fig.1) è il principale bisfenolo, ottenuto dalla reazione di due moli di fenolo con una mole di acetone; questo composto ha attirato maggiormente l'attenzione di scienziati e ricercatori data la sua grande versatilità di utilizzo (Huang *et al.*, 2012). Nonostante il suo largo impiego diverse ricerche hanno dimostrato che il BPA ha effetti tossici, tanto che nel 2017 è stato classificato dall'Agencia Chimica Europea (ECHA) come "sostanza ad alta preoccupazione" con numerosi studi a sostegno delle sue proprietà di possibile interferente endocrino sia nell'uomo che negli animali (Baralla *et al.*, 2021); è stato inoltre riportato che il BPA possiede caratteri di tossicità su più organi che comporta rischi per la salute dei sistemi riproduttivo, nervoso, per lo sviluppo della prole, nonché disturbi metabolici, cancro, malattie cardiovascolari e stress ossidativo (Baralla *et al.*, 2021).

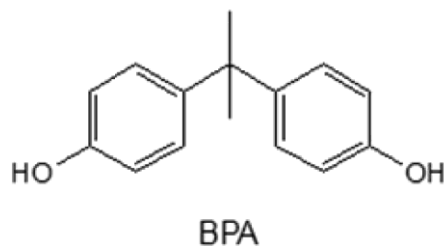


Fig.1: struttura chimica del BPA (Chen *et al.*, 2016).

Dato l'incremento delle regolazioni nell'uso del BPA un elevato numero di composti strutturalmente simili ad esso chiamati "analoghi del BPA" (Baralla *et al.*, 2021) sono sempre più utilizzati come suoi sostituenti nella produzione industriale; tra i più comunemente impiegati ci sono bisfenolo F (BPF o 4,4'-metilenedifenolo), il bisfenolo S (BPS o 4-idrossifenilsolfone) e il bisfenolo AF (BPAF o 4,4'-esafluoroisopropilidene difenolo) (Chen *et al.*, 2016). Tuttavia, anche la sicurezza di quest'ultimi è un tema di dibattito nella comunità scientifica; molti

studi suggeriscono infatti possibili effetti tossici sulla salute di persone e animali in seguito all'esposizione ad analoghi del BPA, confermando che nemmeno i suoi sostituenti possono essere considerati come sostanze completamente sicure (Baralla *et al.*, 2021). Dal punto di vista chimico il BPF (Fig. 2) possiede una bassa viscosità ed una buona resistenza ai solventi tanto che la sua produzione mondiale sta aumentando per essere utilizzato per produrre materiali industriali, resine epossidiche e nel food packaging (Baralla *et al.*, 2021). Il BPS (Fig. 2), costituito da un gruppo solfato che lega due anelli fenolici (Česen *et al.*, 2019), possiede caratteristiche molto più acide degli altri analoghi, un'elevata resistenza al calore e alla luce e una bassa biodegradabilità in acqua marina rispetto al BPA tanto da renderlo molto più persistente nell'ambiente (Baralla *et al.*, 2021). Il BPAF (Fig. 2) viene molto utilizzato nella produzione di elastomeri, fibre ottiche ed apparecchi elettronici nonostante la sua tossicità rilevata da molti studi sulla salute umana e animale (Baralla *et al.*, 2021).

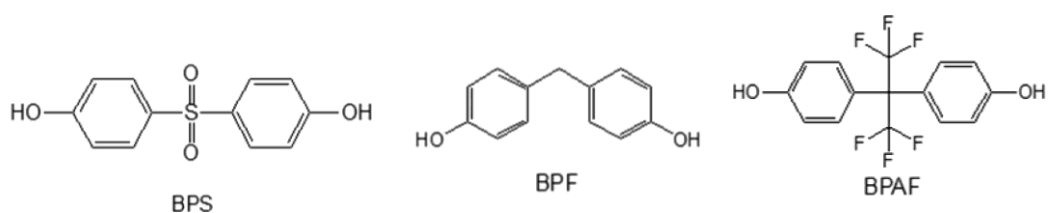


Fig. 2: struttura chimica di analoghi del BPA (Chen *et al.*, 2016).

1.1.1 Produzione e usi

I bisfenoli possiedono un ampio range di applicazioni sulla base dei diversi gruppi sostituenti che vanno a legare i due anelli aromatici conferendone le diverse caratteristiche e proprietà (Vasiljevic e Harner, 2021). Il BPA e tutti i suoi analoghi sono largamente utilizzati nella produzione di policarbonati, resine epossidiche, carta termica e polivinilcloruro oltre che su ampia scala nella produzione di plastica a scopo di consumo, tra cui giocattoli, tubature dell'acqua, contenitori per bevande, rivestimenti interni della maggior parte di lattine e contenitori per alimenti, lenti di occhiali, attrezzatura sportiva, elettronica e medica (Rochester e Bolden, 2015). Il Bisfenolo A è una delle sostanze chimiche maggiormente prodotte a livello mondiale, la sua produzione attuale globale ammonta a circa 8 milioni di tonnellate all'anno (Vasiljevic e Harner, 2021) di cui più di 100 tonnellate ne vengono annualmente rilasciate in atmosfera (Vandenberg *et al.*, 2009). Studi recenti hanno esaminato la presenza di BPA nei materiali plastici polimerici multicomponente (MPC) diversi dal policarbonato e dalle resine epossidiche, concentrandosi in particolare sul polivinil cloruro (PVC) e nel polietilene tereftalato (PET), dimostrando come questa sostanza possa passare facilmente dalla plastica

all'ambiente e all'uomo tramite un elevato numero di possibili vie d'esposizione (H. Wang *et al.*, 2021). Le normative europee, visto il suo grande campo di utilizzo e possibile pericolosità, fanno principalmente riferimento al BPA. Il suo utilizzo non viene vietato, ma regolato limitandone l'uso come monomero all'interno dei materiali plastici destinati al contatto con il cibo seguendo le indicazioni della Commission Regulation (EU) No 10/2011/E. Tale legge regola l'utilizzo di tutte le sostanze chimiche che si trovano nelle plastiche e che vengono utilizzate nel settore industriale per la costruzione di qualsiasi oggetto che sia a contatto con il cibo dato il possibile rischio nel passaggio di queste sostanze nei cibi o bevande a seguito di lisciviazione della plastica («Bisfenolo A | EFSA», s.d.). La quantità massima consentita di BPA, inteso come limite di migrazione specifico, nei prodotti alimentari è limitata a 0.5 mg per Kg di prodotto («Bisfenoli - ECHA», s.d.). Recentemente, all'inizio del 2020 è entrato in vigore il divieto da parte dell'Unione Europea di utilizzo del BPA nella carta termica che può essere immessa solo in concentrazione uguale o inferiore allo 0,02% in peso (Gorini e Bianchi, 2020).

1.1.2 Livelli ambientali

I bisfenoli vengono utilizzati in innumerevoli processi industriali principalmente come composti alla base della sintesi di altre molecole, il che ha reso la loro presenza ubiquitaria venendo ritrovati nelle matrici di acqua, sedimenti, aria e biomassa (Baralla *et al.*, 2021). I Bps possono venire rilasciati nell'ambiente attraverso diversi meccanismi come la deposizione atmosferica, acque reflue urbane e scarichi di acque reflue da produzione e trattamento dei materiali a base di bisfenoli (Baralla *et al.*, 2021). Per questo motivo i bisfenoli possono sia migrare nell'atmosfera che entrare nei corpi d'acqua tramite la pioggia (Huang *et al.*, 2012). Tra tutti gli analoghi del bisfenolo, più di 20 sono stati ritrovati in ambiente a conferma della loro facile diffusione nelle diverse matrici dato il loro grande utilizzo (Baralla *et al.*, 2021). In aggiunta le diverse caratteristiche chimico-fisiche di questi composti determinano fortemente il loro comportamento ambientale. Infatti, i bisfenoli con un basso coefficiente di bioaccumulo, determinato in base al coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log K_{ow}$), tendono ad essere rilevati soprattutto nella matrice acquatica (BPS, BPF e BPA) mentre composti con un alto valore del coefficiente è più probabile che vengano ritrovati nel sedimento e nei tessuti degli organismi (BPB, BPAF) (Baralla *et al.*, 2021). Tra gli organismi acquatici i molluschi bivalvi, essendo organismi filtratori, sembrano essere tra i gruppi di organismi più soggetti ad assorbire e bioaccumulare queste sostanze e per questo motivo sono considerate specie importanti per il monitoraggio di qualità e sicurezza dell'acqua oltre ad essere utilizzati come organismi indicatori per l'inquinamento ambientale (Ward *et al.*, 2019). In ambiente il composto più

comunemente rilevato è il BPA che è stato rilevato nei molluschi dei mari di tutto il mondo in concentrazioni che variano da pochi a centinaia di ng/g di tessuto (Casatta *et al.*, 2015). In Italia le concentrazioni più basse di BPA sono state trovate nell'area meridionale del Delta del Po nel Mar Adriatico in vongole (*Ruditapes philippinarum*), con livelli a partire da 3,3 fino a 9,5 ng/g in un sito di prelievo in cui la concentrazione di BPA rilevata nei sedimenti corrispondeva a 3-4.2 ng/g (Casatta *et al.*, 2015); nel caso invece della concentrazione in acqua del fiume Po sono emersi livelli fino a centinaia di ng/L (Viganò *et al.*, 2006). In Italia nella Laguna di Venezia sono state riscontrate concentrazioni di BPA in un range da 1,0 fino a 145 ng/L (Pojana *et al.*, 2007). Per quanto riguarda gli analoghi, studi condotti su campioni di acqua marina nella regione est del Mar Cinese hanno evidenziato concentrazioni di BPA pari a 325 ng/L e di BPF di 373 ng/L; analisi sui sedimenti della stessa area rilevano sempre BPA come il principale bisfenolo presente (2.2–34 ng/g) seguito da BPF (con concentrazione massima pari a 5.4 ng/g), BPS (0.12–5.4 ng/g), e BPAF (concentrazione massima di 0.97 ng/g) (Xie *et al.*, 2022). Negli effluenti del fiume Sava in Croazia sono state rilevate concentrazioni di BPAF da 0,0367 - 3,40 ng/L, di BPF da 2,54 - 117 ng/L, e BPS da 108 - 435 ng/L (Česen *et al.*, 2019). In realtà i bisfenoli possono essere biodegradati naturalmente principalmente da batteri, utilizzandoli come fonte di carbonio e substrato per produrre energia, e secondariamente da funghi, alghe e piante; questi sono dei processi che dipendono dalla biodisponibilità dei composti e dalle specie batteriche presenti oltre che a fattori ambientali come temperatura, pH e nutrienti, perciò questi processi naturali non sono sufficienti per riuscire a stabilire un equilibrio di biodegradazione rispetto all'elevata quantità di emissioni antropiche (de Morais Farias e Krepsky, 2022).

2. SCOPO DELLA TESI

In questa tesi sono stati valutati gli effetti di tre dei principali analoghi del BPA: BPAF, BPF e BPS e della loro miscela, in esemplari di granchio *Carcinus aestuarii* alimentati con vongole (*Ruditapes philippinarum*) esposte precedentemente a una concentrazione ambientale dei tre bisfenoli - singolarmente o in miscela (MIX) - per un periodo di 14 giorni. L'obiettivo di questo studio è stato di valutare se granchi alimentati con vongole contaminate da bisfenoli potessero subire alterazioni nel loro metabolismo e nel sistema antiossidante. Al tal fine, in questo studio sono stati valutati alcuni biomarkers di stress ossidativo, quali glutazione perossidasi (GPX), glutazione reduttasi (GR) e glutazione-S-transferasi (GST). In aggiunta sono state valutate le attività enzimatiche degli enzimi amilolitici e l'eventuale alterazione a carico del sistema di trasporto elettronico mitocondriale (ETS). La scelta del granchio *C. aestuarii* come organismo modello è stata dettata dal fatto che questa specie è un ottimo modello in ecotossicologia, essendo un organismo relativamente semplice da mantenere in condizioni sperimentali, oltre ad essere una specie molto diffusa e rilevante dal punto di vista economico. La scelta dei tre analoghi (BPS, BPF, BPAF) è dipesa dalle loro caratteristiche chimiche: due di questi sono composti idrofobi, il BPF e BPAF, mentre il BPS è idrofilo. I tessuti dei granchi analizzati in questa tesi sono stati la branchia, organo deputato alla respirazione e l'epatopancreas, organo adibito alla digestione delle sostanze ingerite dall'organismo e perciò tessuto di possibile accumulo anche di sostanze tossiche.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Acclimatazione ed esposizione delle vongole

Per la prima fase dell'esperimento, 70 esemplari di vongola *Ruditapes philippinarum* provenienti da zone di concessione della Laguna di Venezia sono state disposte in vasche di acclimatazione per 7 giorni riempite con acqua di mare in assenza di contaminanti; successivamente i bivalvi sono stati posti in acquari di vetro da 30 L ciascuno, privi di sabbia, con acqua marina (salinità 35 ± 1) a temperatura di $19 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Gli organismi, suddivisi in tre vasche per ciascuna condizione sperimentale, sono stati mantenuti per due settimane durante le quali l'acqua veniva rinnovata a giorni alterni; dopo il cambio dell'acqua veniva somministrata una miscela di microalghie delle specie *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis chuii* come nutrimento delle vongole. Nelle vasche sono stati aggiunti i tre diversi bisfenoli BPF, BPS, BPAF a una concentrazione pari a 300 ng/L, mentre nelle vasche contenenti la miscela dei tre bisfenoli la concentrazione dei singoli era pari a 100 ng/L (300 ng/L in totale). Le vongole di controllo erano mantenute in acqua priva di contaminanti. Per questo scopo sono state preparate tre soluzioni madre (100 mg/L): il BPS è stato sciolto in acqua distillata, mentre BPF e BPAF sono stati sciolti in metanolo. terminate le due settimane, tempo necessario per l'accumulo dei contaminanti (Fabrello *et al.*, 2023), le vongole sono state prelevate, sgusciate e conservate in fogli di alluminio per essere poi congelate a -20°C fino al loro utilizzo.

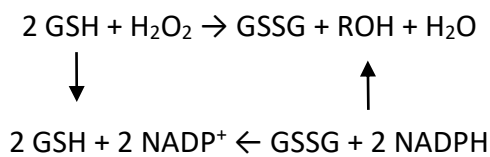
3.2 Stabulazione e alimentazione dei granchi con vongole contaminate

Gli esemplari (300) della specie *C. aestuarii* provenienti dalla Laguna di Venezia sono stati sottoposti ad una fase di acclimatazione, durata sette giorni, e successivamente suddivisi nelle 5 condizioni sperimentali (2 acquari per condizione): granchi nutriti con vongole non contaminate (controllo), contaminate con ognuno dei tre bisfenoli testati o con la loro miscela. Gli acquari e l'acqua marina avevano le medesime caratteristiche impiegate nell'esposizione delle vongole ed è stato applicato un fotoperiodo di 10 ore di luce e 14 di buio. Per evitare variazioni nella risposta degli organismi data dal sesso, sono stati utilizzati esclusivamente esemplari maschi facilmente individuabili dal dimorfismo sessuale che caratterizza la specie. L'esposizione degli organismi è durata due settimane nelle quali l'acqua veniva cambiata a giorni alterni e con la stessa cadenza temporale veniva somministrato il cibo, in modo da consentire agli organismi di consumare tutto il nutrimento fornito ($\frac{1}{2}$ vongola per granchio). Dopo 7 giorni dall'inizio dell'esperimento è stato svolto un primo campionamento dei tessuti allestendo 5 "pool" da 4 animali ciascuno, omogenei tra loro per taglia, per

ciascuna condizione sperimentale. Ciascun organismo è stato anestetizzato in ghiaccio per consentire il prelievo di branchie ed epatopancreas. I campioni successivamente sminuzzati sono stati inseriti in provette e congelati in azoto liquido e mantenuti a -80°C fino al momento del loro utilizzo. Dopo 14 giorni, è stato svolto il secondo prelievo dei tessuti con le stesse modalità del primo.

3.3 GPX

La glutatione perossidasi (GPX) fa parte di un gruppo di enzimi con funzione di difesa antiossidante che catalizzano la riduzione dell'acqua ossigenata, in cui il GSH agisce come donatore di elettroni e una volta ossidato (GSSG) viene rigenerato per mezzo della glutatione reduttasi (GR) grazie alla presenza di NADPH.



L'analisi dell'attività della GPX è stata svolta sul supernatante di branchie ed epatopancreas ottenuto omogeneizzando il corrispondente tessuto. A tal fine il campione di tessuto è stato omogeneizzato in tampone di omogeneizzazione, preparato con 1,21 g di TRIS/1 L di acqua distillata (0.00999 M), 11,2 g di KCl (0,15 M), 171,2 g di saccarosio (0,5 M) e portato a pH 7,6 con HCl, utilizzando un omogenizzatore TissueLyser LT e di seguito centrifugato per 30 minuti a 12000 rpm a 4°C per ottenere il supernatante. Il metodo seguito per la misura dell'attività della GPX è quello proposto da Livingstone *et al.* (1992) in cui la determinazione dell'attività enzimatica viene svolta tramite la misura allo spettrofotometro del decremento di assorbanza misurata per 1 minuto a 340 nm; l'attività viene infine espressa in nmoli/ min/ mg proteine.

3.4 GR

L'enzima glutatione reduttasi (GR) è in grado di convertire il glutatione da stato ossidato (GSSG) a stato ridotto (GSH) andando a ricostituire le riserve di GSH. L'enzima GR è stato valutato sia nella branchia che nell'epatopancreas seguendo il metodo proposto da Smith *et al.* (1988), importante nella reazione è il NADPH che fornisce l'energia per trasformare GSSG in GSH cedendo elettroni al primo consentendo la rigenerazione del secondo:



Successivamente il GSH reagisce spontaneamente con acido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) originando acido 5-thio (2-nitrobenzoico) (TNB). Il TNB viene rilevato grazie ad un incremento di assorbanza osservato a 412 nm;

l'aumento di assorbanza è perciò direttamente proporzionale all'attività della GR. L'attività della GR viene infine espressa in U/mg proteine (unità per mg di proteine).

3.5 GST

Le glutation-S-transferasi (GST) sono una famiglia di isoenzimi detossificanti citosolici e microsomiali che catalizzano la coniugazione di varie molecole tossiche con il glutatione (GSH). Il GST possiede un ruolo "sentinella" in quanto questo enzima nelle cellule dell'organismo ha funzione di eliminare diverse sostanze tossiche nell'animale; lo xenobiota viene coniugato con una molecola di GSH (con funzione antiossidante) nelle GST (glutation-S-transferasi) e reso più facilmente eliminabile tramite urine e feci. Il metodo seguito in questa analisi è quello proposto da Habig *et al.* (1974), in cui il GSH viene coniugato al substrato (CDNB) generando un aumento di assorbanza a 340 nm determinando perciò la diretta proporzionalità tra tasso di incremento dell'assorbanza e attività della GST. Questo enzima è stato valutato solo nei campioni di tessuto di epatopancreas (di 7 e 14 giorni) data la natura del tessuto (organo digestivo delle sostanze ingerite dall'organismo tramite l'alimentazione). I risultati vengono espressi come nmol/min/mg proteine.

3.6 Enzimi amilolitici

I due enzimi presi in considerazione sono l' α amilasi e amiloglicosidasi, che hanno la funzione di digerire l'amido in monomeri di zucchero tramite idrolisi così da poterli utilizzare come fonte energetica. Una modifica al metabolismo dell'organismo potrebbe provocare sia una sua accelerazione sia un suo rallentamento, che viene tradotto rispettivamente in un eccessivo consumo delle risorse energetiche o un accumulo di amido; Quest'analisi è stata svolta solo nell'epatopancreas ed il metodo seguito è stato quello proposto da Oliveira *et al.* (2009). Brevemente, l'analisi viene svolta direttamente in micropiastra in cui il supernatante viene incubato per 30 minuti a 37°C con una soluzione di salda d'amido. Successivamente la reazione viene interrotta e il livello di amido residuo viene quantificato tramite una soluzione di KI/I₂ leggendo poi l'assorbanza a 505 nm. L'assorbanza viene poi convertita in attività enzimatica tramite un'apposita curva di calibrazione. I risultati vengono espressi come U amyl/mg proteine.

3.7 ETS

L' *Electron Transport System* (ETS) presente nei mitocondri partecipa al processo di fosforilazione ossidativa creando un gradiente elettronico che viene poi utilizzato dall'ATP sintetasi per produrre ATP. Una alterazione nella sua efficienza

ci conferisce perciò delle informazioni riguardo alla produzione di energia nella cellula e nel tessuto oltre che ad un eventuale danno a carico dei mitocondri. L'analisi è stata effettuata sia nella branchia che nell'epatopancreas utilizzando il metodo proposto da De Coen and Janssen *et al* (1997). Nel dettaglio, al campione viene aggiunta una soluzione di NADPH e NADH in modo da saturare il sistema di trasporto degli elettroni. Successivamente viene aggiunto lo iodionitrotetrazodio (INT) che funge da accettore elettronico convertendosi in sale di formazano e passando da una colorazione giallastra ad un rosso/viola che viene rilevato tramite lettura al lettore di micropiastre a 490 nm. La quantità di INT che viene convertita in formazano è quindi direttamente proporzionale all'attività dell'ETS. I risultati vengono espressi in nmol/min/mg proteine.

3.8 Proteine totali

L'analisi del contenuto proteico totale di ogni campione di tessuto omogeneizzato è stata svolta attraverso il metodo di Bradford *et al.* (1976) (20µL di supernatante + 1 mL di reagente Bradford). Dopo un'incubazione di 10 minuti, l'assorbanza è stata letta a 595 nm allo spettrofotometro e i risultati sono stati espressi come mg proteine/mL.

3.9 Analisi statistica

I risultati sono stati analizzati mediante l'ANOVA a due vie per evidenziare gli effetti dei fattori indipendenti "tempo di trattamento", "trattamento(=dieta)" e "interazione tra tempo e trattamento". Successivamente è stato svolto il test di Fisher (LSD) per il confronto a coppie. I risultati sono stati riportati come boxplot in cui viene riportata la mediana e l'interquartile. Per l'analisi statistica è stato usato il software OriginPro 2023.

4. RISULTATI

4.1 Attività della GPX nella branchia

L'ANOVA a due vie ha indicato che l'attività dell'enzima GPX nella branchia dei granchi è stata alterata da due fattori: dal "Tempo" ($p < 0,01$) e dall'interazione tra il "Trattamento" ed il "Tempo" ($p < 0,05$) (Tabella 1). Il test post-hoc evidenzia una sola diminuzione statisticamente significativa dell'attività della GPX negli animali alimentati per 14 giorni con vongole esposte a BPF, rispetto al controllo (Figura 1).

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
tempo	1	6,52571E-5	6,52571E-5	12,47452	0,00106
trattamento	4	2,59678E-5	6,49194E-6	1,241	0,30913
Interaction	4	5,99962E-5	1,4999E-5	2,86721	0,03526
Model	9	1,51221E-4	1,68023E-5	3,21193	0,0051
Error	40	2,09249E-4	5,23123E-6		
Corrected Total	49	3,6047E-4			

Tabella 1: ANOVA a due vie per GPX in branchia

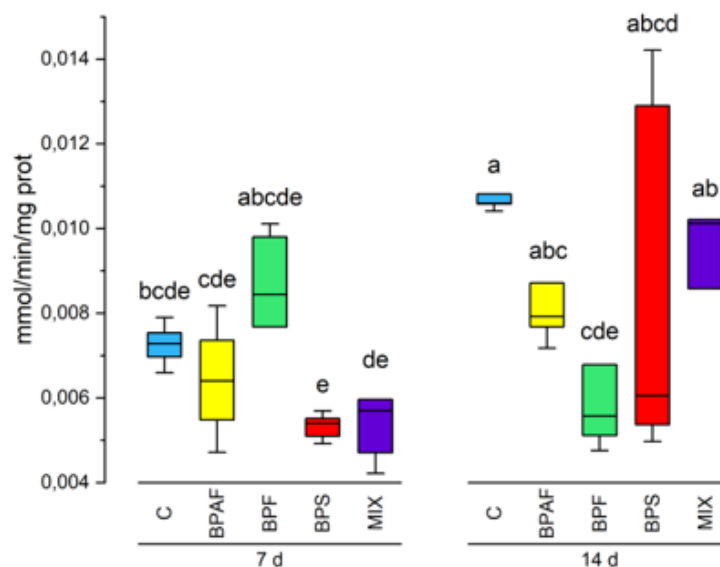


Fig. 1: attività della GPX in branchia, espressa in nmol/min/mg proteine. Le lettere non condivise indicano differenze statisticamente significative. N=5.

4.2 Attività della GPX nell'epatopancreas

L'attività enzimatica è stata alterata dall'interazione tra i due fattori "Tempo*Trattamento" ($p < 0,001$) e, rispetto al precedente, anche dal "Trattamento" ($p < 0,001$) (Tabella 2). Dal test post-hoc emerge un aumento significativo dell'attività rispetto al controllo negli organismi alimentati per 7 giorni con vongole esposte a BPAF e BPF, mentre negli organismi alimentati per 14 giorni con vongole contaminate da BPF, BPS e MIX si osserva una diminuzione significativa dell'attività dell'enzima (Fig. 2).

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
tempo	1	8,58967E-7	8,58967E-7	0,17026	0,68208
trattamento	4	1,25871E-4	3,14677E-5	6,23739	5,34977E-4
Interaction	4	1,1651E-4	2,91274E-5	5,77352	9,15332E-4
Model	9	2,43239E-4	2,70266E-5	5,3571	<0.0001
Error	40	2,018E-4	5,04501E-6		
Corrected Total	49	4,4504E-4			

Tabella 2: ANOVA a due vie per GPX in epatopancreas.

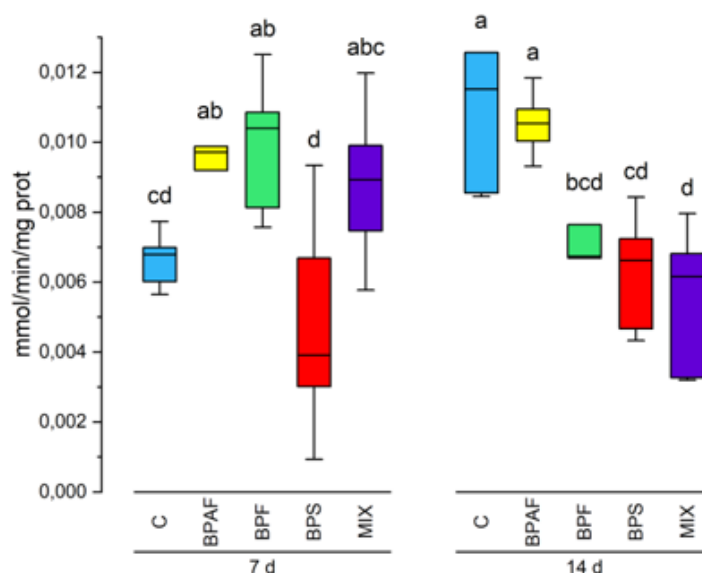


Figura 2: attività della GPX nell'epatopancreas, espressa in nmol/min/mg proteine. Le lettere non condivise indicano differenze statisticamente significative. N=5.

4.3 Attività della GR nella branchia

L'ANOVA a due vie ha indicato che l'attività dell'enzima GR nella branchia dei granchi è stata alterata solo dal fattore "Tempo di trattamento" ($p < 0.001$) (Tabella 3). Poiché né il "Trattamento" né la sua interazione con il "Tempo" sono risultati statisticamente significativi non si è proceduto a svolgere il test post-hoc (Fig. 3).

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
tempo	1	0,04126	0,04126	20,06183	<0.0001
trattamento	4	0,00559	0,0014	0,67955	0,61019
Interaction	4	0,00895	0,00224	1,08843	0,37528
Model	9	0,05581	0,0062	3,01486	0,00767
Error	40	0,08227	0,00206		
Corrected Total	49	0,13807			

Tabella 3: ANOVA a due vie per GR in branchia

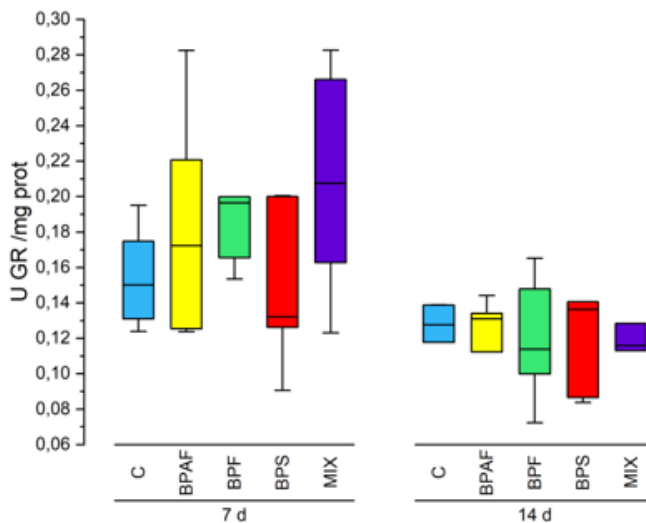


Fig. 3: attività della GR nella branchia, espressa in U GR/mg proteine. N=5.

4.4 Attività della GR nell'epatopancreas

Al contrario della branchia, nell'epatopancreas l'attività dell'enzima è stata alterata dal fattore "Trattamento" ($p < 0.05$) (Tabella 4). Tuttavia, il test post-hoc non ha indicato alcuna differenza statisticamente significativa tra trattati e controllo (Fig. 4).

Overall ANOVA

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

Tabella 4: ANOVA a due vie per GR in epatopancreas

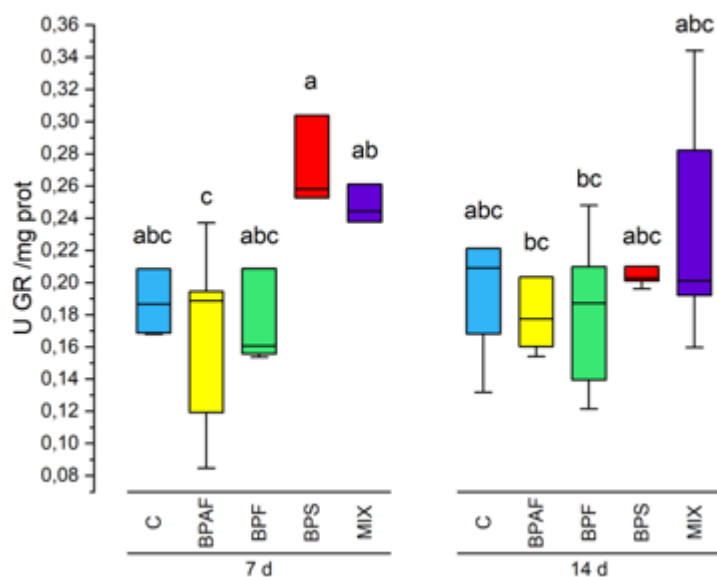


Fig. 4: attività della GR nell'epatopancreas, espressa in U GR/mg proteine. Le lettere non condivise indicano differenze statisticamente significative. N=5

4.5 Attività della GST nell'epatopancreas

L'attività dell'enzima GST nella ghiandola è stata alterata per effetto del "Trattamento" ($p < 0,05$) e dell'interazione dai fattori "Tempo*Trattamento" ($p < 0,01$). Il test post-hoc ha inoltre evidenziato una riduzione statisticamente significativa dell'attività dell'enzima negli animali alimentati per 7 giorni con vongole contaminate da BPAF e MIX (Fig. 5).

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
tempo	1	32644,804 1	32644,804 1	0,25155	0,61873
trattamento	4	1739830,3 3746	434957,58 436	3,35169	0,01857
Interaction	4	2477655,2 5712	619413,81 428	4,77307	0,00304
Model	9	4250130,3 9868	472236,71 096	3,63896	0,00214
Error	40	5190903,3 9025	129772,58 476		
Corrected Total	49	9441033,7 8893			

Tabella 5: ANOVA a due vie per GST in epatopancreas

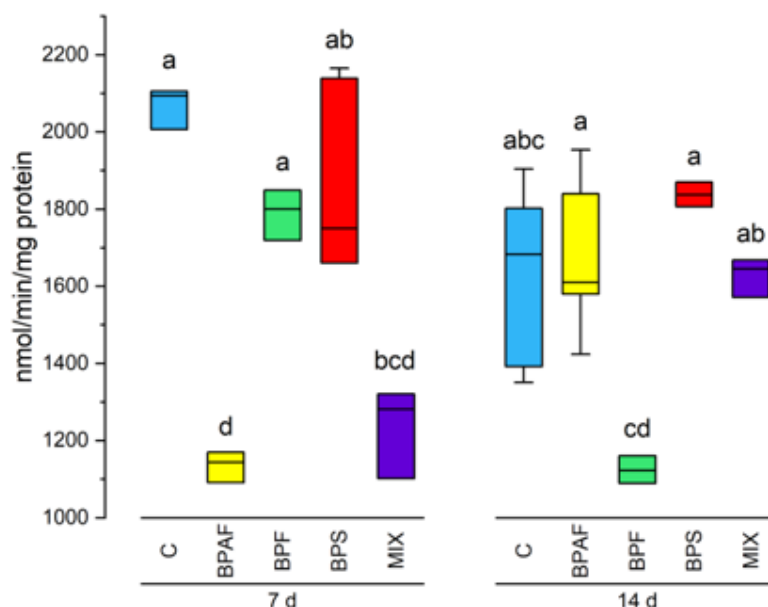


Fig. 5: attività della GST nell'epatopancreas, espressa in nmol/min/mg di proteine. Le lettere non condivise indicano differenze statisticamente significative. N=5.

4.6 Attività degli enzimi amilolitici nell'epatopancreas

L'attività degli enzimi amilolitici nell'epatopancreas è stata alterata dai due fattori "Tempo di trattamento" ($p < 0,01$) e "Trattamento" ($p < 0,001$) (Tabella 6). Il successivo test post-hoc ha evidenziato una diminuzione statisticamente significativa rispetto al controllo dell'attività degli enzimi nei granchi alimentati per 7 giorni con vongole contaminate da BPS e MIX. Inoltre, si osserva una diminuzione statisticamente significativa dell'attività enzimatica in tutti i gruppi sperimentali alimentati con vongole contaminate per 14 giorni.

Overall ANOVA

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

Tabella 6: ANOVA a due vie per enzimi amilolitici in epatopancreas

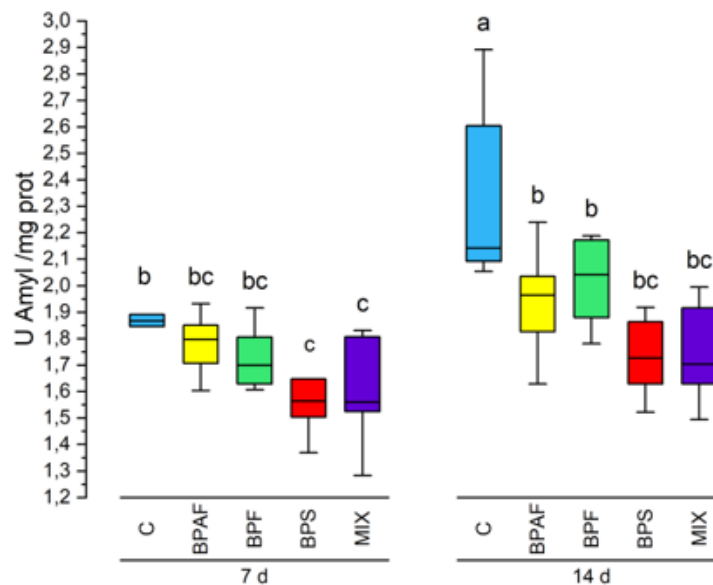


Fig. 6: attività degli enzimi amilolitici nell'epatopancreas, espressa in U amyl/mg proteine. Le lettere non condivise indicano differenze statisticamente significative. N=5.

4.7 Attività dell'ETS nella branchia

L'ANOVA a due vie ha indicato un effetto significativo solo del fattore "Tempo di trattamento" ($p < 0,001$) (Tabella 7). Anche in questo caso poiché né il "Trattamento" né la sua interazione con il "Tempo" sono risultati statisticamente significativi, non si è proceduto a svolgere il test post-hoc (Fig. 7).

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
tempo	1	5,68613E-5	5,68613E-5	26,50486	<0.0001
trattamento	4	1,97736E-5	4,9434E-6	2,30428	0,07502
Interaction	4	1,72006E-5	4,30015E-6	2,00444	0,11236
Model	9	9,38355E-5	1,04262E-5	4,85997	2,05041E-4
Error	40	8,58126E-5	2,14532E-6		
Corrected Total	49	1,79648E-4			

Tabella 7: ANOVA a due vie per ETS in branchia

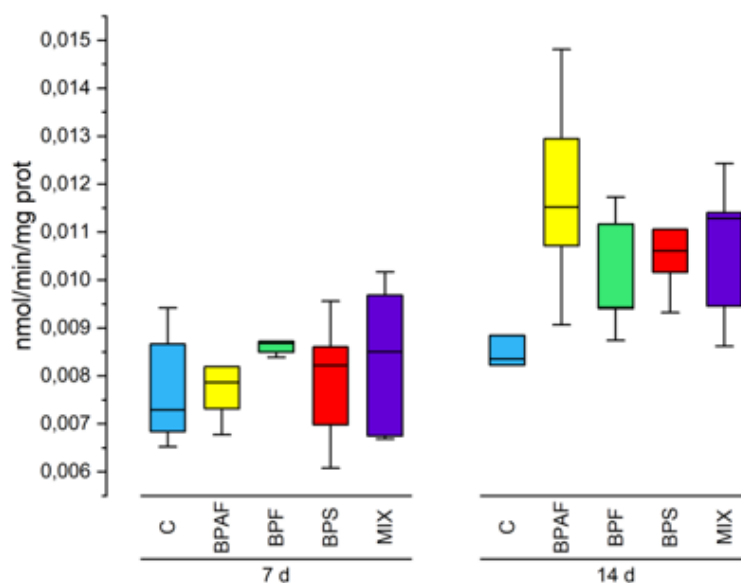


Fig. 7: attività ETS nella branchia, espressa come nmol/min/mg proteine. N=5

4.8 Attività dell'ETS nell'epatopancreas

L'attività dell'ETS nell'epatopancreas non ha riportato alcuna alterazione statisticamente significativa per nessuno dei fattori considerati (Tabella 8); per questo motivo sono non si è proceduto a svolgere il test post-hoc (Fig.8).

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
tempo	1	4,90528E-7	4,90528E-7	0,05209	0,82062
trattamento	4	5,86353E-5	1,46588E-5	1,55677	0,20454
Interaction	4	1,51196E-5	3,7799E-6	0,40143	0,80644
Model	9	7,42454E-5	8,24949E-6	0,8761	0,55403
Error	40	3,76647E-4	9,41617E-6		
Corrected Total	49	4,50892E-4			

Tabella 8: ANOVA a due vie per ETS in epatopancreas

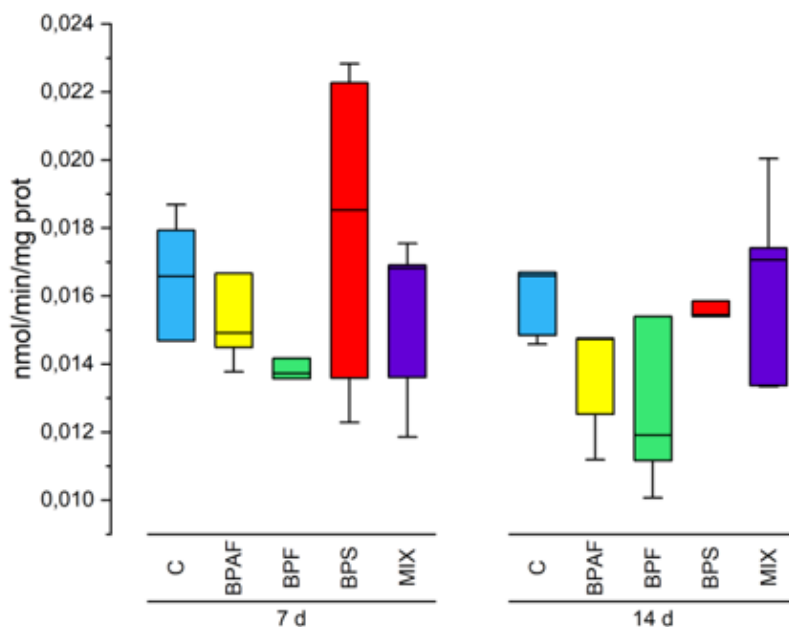


Fig. 8: attività ETS nell'epatopancreas misurata in nmol/min/mg proteine. N=5.

5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Essendo questo studio tra i pochi che hanno analizzato gli effetti tossici degli analoghi del Bisfenolo A (BPS, BPF, BPAF, MIX) in granchi (*Carcinus aestuarii*) alimentati con cibo contaminato, la discussione dei risultati ottenuti è stata fatta facendo riferimento a studi riguardanti gli effetti di diversi contaminanti forniti via acqua o cibo in organismi acquatici.

In *C. aestuarii* sono stati valutati alcuni biomarkers di stress ossidativo, come gli enzimi coinvolti nel ciclo del glutatione (GR, GPX, GST), importanti per il ruolo centrale che svolgono nella rimozione delle forme reattive dell'ossigeno (ROS), come l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il radicale idrossile (OH^\cdot), oltre ad essere in grado di convertire i composti xenobiotici in molecole meno tossiche ed idrofile facilitandone quindi l'eliminazione per escrezione.

Gli organismi esposti a contaminanti possono subire un'alterazione del loro sistema di difesa antiossidante, aumentando o riducendo sia la produzione di enzimi antiossidanti sia la loro attività in risposta alla presenza di composti inquinanti. Nel presente studio, la valutazione di questi biomarker di stress ossidativo è stata condotta su branchia ed epatopancreas dei granchi alimentati con vongole contaminate. In generale, l'epatopancreas nei crostacei svolge funzioni tipiche del fegato nei vertebrati, oltre ad essere coinvolto anche in diverse funzioni, come l'attivazione della pro-fenolossidasi, la regolazione del sistema neuroendocrino-immune, l'assorbimento dei nutrienti e la produzione di enzimi digestivi (Kim e Kwak, 2022).

I risultati ottenuti hanno indicato che l'attività della GPX nella branchia ha subito una diminuzione statisticamente significativa negli animali alimentati per 14 giorni con vongole esposte al BPF; per quanto riguarda gli effetti sull'epatopancreas invece, si è osservato un aumento significativo dell'attività della GPX negli organismi alimentati con vongole contaminate da BPF e BPAF per 7 giorni e una diminuzione dell'attività negli organismi alimentati per 14 giorni con vongole contaminate da BPF, BPS e MIX. In alcuni studi condotti su esemplari maschi di zebrafish (*Danio rerio*) sulla tossicità acuta (96 ore) di BPF e BPS (a concentrazioni di 0, 1, 1, 10, 100, and 1000 $mg \cdot L^{-1}$), si è evidenziato che la tossicità del primo è più elevata rispetto al secondo (Han *et al.*, 2021), similmente a quanto osservato nel nostro studio, dove infatti il BPF è stato in grado di alterare l'attività enzimatica della GPX in entrambi i tessuti, rispetto al BPS che ha agito esclusivamente sulla branchia. Dallo stesso studio è emerso che l'espressione dei geni per GPX è stata inibita nei gruppi di organismi trattati con BPS (Han *et al.*, 2021).

In un altro studio condotto su epatociti isolati dalla trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) esposti per 24 ore a diverse concentrazioni di BPF, è stato osservato un notevole aumento dell'attività della GPX a tutte le concentrazioni di BPF testate, 0, 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250, e 500 μM (ad eccezione di 15 μM) (Aykut e Kaptaner, 2021). Nelle loro conclusioni gli autori hanno interpretato questi risultati come un tentativo delle cellule di far fronte allo stress ossidativo causato dal BPF (Aykut e Kaptaner, 2021). Da queste osservazioni emerge che l'attività della GPX può essere aumentata nel breve periodo, come è accaduto nel nostro studio nei granchi alimentati con cibo contaminato da BPF e BPS. Per quanto riguarda il BPAF, un recente studio svolto su zebrafish ha suggerito che l'esposizione al composto può aumentare lo stress ossidativo inducendo l'aumento della concentrazione di ROS nell'organismo (Wang *et al.*, 2023).

In questo lavoro di tesi è stata valutata anche l'attività delle GST; dalle analisi è emersa una diminuzione statisticamente significativa dell'attività nei granchi alimentati per 7 giorni con vongole contaminate da BPAF e MIX. Questo risultato è in accordo con uno studio svolto sul gambero d'acqua dolce (*Procambarus clarkii*) in cui l'espressione di geni antiossidanti (quali le GST) nell'epatopancreas diminuiva all'aumentare della concentrazione di BPS a cui sono stati esposti (0 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, and 100 $\mu\text{g/L}$) (Pu *et al.*, 2024).

Al contrario, analisi svolte sul tessuto respiratorio di esemplari di cetriolo di mare (*Holothuria poli*) non hanno mostrato nessun effetto sull'attività della GST negli organismi esposti a BPS. Tuttavia, la GST è stata alterata nel tratto respiratorio degli animali esposti ad una miscela di BPS e BPA dello stesso organismo dove invece si osserva un aumento dell'attività della GR, sia negli organismi esposti a BPS che quelli esposti alla miscela di BPS e BPA suggerendo che l'elevata attività antiossidante non è sufficiente a contrastare le ROS (Jenzri *et al.*, 2023).

In uno studio *in vitro* sugli epatociti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) esposti a diverse concentrazioni di BPF, si è osservato un significativo aumento dell'attività della GST a una concentrazione di 125 μM di BPF, mentre essa rimaneva invariata alle altre concentrazioni (Aykut e Kaptaner, 2021).

In gamberi di fiume (*Pontastacus leptodactylus*), gli effetti del BPA sono stati valutati su epatopancreas e branchie, dimostrando come anche questa sostanza influisca sull'attività enzimatica di GST e GR risultando significativamente ridotta rispetto al controllo (Diler *et al.*, 2022).

Alterazioni istologiche gravi, come la distruzione della membrana basale e l'accumulo di emociti, sono state osservate nell'epatopancreas di esemplari del granchio *Macrophthalmus japonicus* in seguito ad esposizione a BPA (1, 10, and 30 $\mu\text{g L}^{-1}$), compromettendo le normali funzioni del fegato (Kim e Kwak, 2022).

Nel presente lavoro di tesi è stata valutata anche l'attività degli enzimi amilolitici. I risultati ottenuti hanno indicato una riduzione statisticamente significativa rispetto al controllo dell'attività enzimatica nei granchi alimentati per 7 giorni con vongole contaminate da BPS e MIX e in tutti i gruppi sperimentali alimentati con vongole contaminate per 14 giorni. Analogamente, uno studio condotto sull'interazione di BPS e α -amilasi nei fanghi da depurazione, ha mostrato una chiara diminuzione dal 100% all'82,1% dell'attività dell' α -amilasi correlato all'aumento graduale di concentrazione di BPS, suggerendo che il BPS può interagire con l' α -amilasi e inibirne l'attività, specialmente ad alte concentrazioni e con il prolungarsi del tempo (Yang *et al.*, 2017).

Un'ulteriore conferma dall'azione inibitoria causata dal BPS ci viene fornita da uno studio condotto su *Oreochromis mossambicus* (Kumar, 2021). Tale ricerca dimostra che il BPS può causare cambiamenti significativi (diminuzione) nel metabolismo mitocondriale e che le cause di queste alterazioni sembrano essere il risultato di un'elevata domanda energetica. Infatti, in seguito all'esposizione dei pesci a dosi subletali di BPS, l'attività dell'enzima citocromo c ossidasi nel sistema di trasferimento degli elettroni, che ha la funzione di trasferire gli elettroni al loro accettore finale, diminuiva significativamente. Secondo gli autori, dato che l'attività di questo enzima indica la capacità aerobica dei tessuti, una sua diminuzione indicherebbe chiaramente una riduzione della respirazione mitocondriale e del metabolismo ossidativo, con conseguente ridotta sintesi di ATP (Kumar, 2021).

Nel presente studio è stato valutato anche l'ETS che però non ha subito alcuna alterazione rispetto al controllo.

Riassumendo, in questo studio sono state riscontrate variazioni statisticamente significative (aumenti e diminuzioni) dei biomarker di stress ossidativo e di funzionalità mitocondriale, che suggeriscono come gli analoghi del bisfenolo A (BPF, BPS, BPAF) e la loro miscela (MIX) possano causare effetti tossici nei granchi (*C. aestuarii*) se forniti attraverso l'alimentazione di cibo contaminato, rappresentando un possibile rischio ecotossicologico. I risultati dello studio suggeriscono che gli analoghi del BPA, nonostante il loro crescente utilizzo e la loro crescente diffusione in ambiente, non siano sostanze innocue ma presentano profili di tossicità non trascurabile e paragonabile a quella del BPA.

Questo studio non è però sufficiente da solo a definire la pericolosità di questi composti nella catena alimentare marina e sono necessari ulteriori approfondimenti per implementare la conoscenza e poter confrontare i risultati ottenuti su specie diverse.

LETTERATURA CITATA

Aykut H., Burak K., 2021. In vitro effects of bisphenol F on antioxidant system indicators in the isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Biology Reports* 48 (3): 2591–99.

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

Biju K., 2021. *Journal of Aquatic Biology & Fisheries*; Volume 9; Issue 1. Bisphenol S Induced Metabolic Disruption in a Freshwater Fish, *Oreochromis Mossambicus*: 11:68-75

«Bisfenoli - ECHA». s.d. Consultato 24 luglio 2024. <https://echa.europa.eu/it/hot-topics/bisphenols>

«Bisfenolo A|EFSA». s.d. Consultato 24 luglio 2024. <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/bisphenol>

Casatta N., Mascolo G., Roscioli C., e Viganò L., 2015. Tracing endocrine disrupting chemicals in a coastal lagoon (Sacca di Goro, Italy): Sediment contamination and bioaccumulation in Manila clams. *Science of The Total Environment* 511:214–22.

Česen M., Ahel M., Terzić S., Heath D.J., e Heath E., 2019. The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava River. *Science of The Total Environment* 650:2446–53.

Changchang P., Yuanyi L., Jianshuang M., Lixiao H., Yinfeng C., Boyang Z., Bingke W., Aimin W., e Chunnuan Z., 2024. Bisphenol S exposed changes in intestinal microflora and metabolomics of freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*. *Aquatic Toxicology* 272:106957.

Chen D., Kurunthachalam K., Hongli T., Zhengui Z., Yong-Lai F., Yan W., e Widelka M., 2016. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environmental Science & Technology* 50 (11): 5438–53.

Diler Öznur, Özil Ö., Demet Nane İ., Nazıroğlu M., Minaz M., Aslankoç R., Özmen Ö., e Atsatan K., 2022. The Effects of Bisphenol A on Oxidative Stress, Antioxidant Defence, Histopathological Alterations and Lysozyme Activity in Narrow-Clawed Crayfish (*Pontastacus leptodactylus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 22 (10).

De Morais Farias J., e Krepsky N., 2022. Bacterial Degradation of Bisphenol Analogues: An Overview. *Environmental Science and Pollution Research* 29 (51): 76543–64.

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

Fabrello J., e V. Matozzo, 2022. Bisphenol Analogs in Aquatic Environments and Their Effects on Marine Species—A Review. *Journal of Marine Science and Engineering* 10 (9): 1271.

Gorini F., e Bianchi F., 2020. Al bando il bisfenolo A. Ma siamo più sicuri? *Micron* 1:1-4

Han Y., Yumeng F., Mingxin W., Yingang X., Hui C., e Yuxuan L., 2021. Study on the joint toxicity of BPZ, BPS, BPC and BPF to zebrafish. *Molecules* 26 (14): 4180.

Huang Y. Q., C. K. C. Wong, J. S. Zheng, H. Bouwman, R. Barra, B. Wahlström, L. Neretin, e M. H. Wong., 2012. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*. 42:91–99.

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

Pojana G., Gomiero A., Jonkers N., e Marcomini A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International* 33 (7): 929–36.

Rochester J. R., e Bolden A. L., 2015. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environmental Health Perspectives* 123 (7): 643–50.

Vandenberg L. N., Maffini M. V., Sonnenschein C., Rubin B., e Soto A., 2009. Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocrine Reviews* 30 (1): 75–95.

Vasiljevic T., e Harner T., 2021. Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *Science of The Total Environment* 789 (ottobre):148013.

Viganò L., Mandich A., Benfenati E., Bertolotti R., Bottero S., Porazzi E., e Agradi E., 2006. Investigating the Estrogenic Risk Along the River Po and Its Intermediate Section. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51 (4): 641–51.

Wang F., Ma X., Sun Q., Zhang Y., Liu Y., Gu J., e Wang L., 2023. Bisphenol B Induces Developmental Toxicity in Zebrafish via Oxidative Stress. *Environmental Science and Pollution Research*, (2023):2-10.

Wang H., Jiang L., Gu S., e Wang X., 2021. Migration of Bisphenol A from Polyvinyl Chloride Plastics to Solvents of Different Polarities and Packaged Food in China. *Packaging Technology and Science* 34 (2): 127–37.

Ward J. E., Zhao S., Holohan B. A., Mladinich K. M., Griffin K. W., Wozniak J., e Shumway S. E., 2019. Selective ingestion and egestion of plastic particles by the blue mussel (*Mytilus edulis*) and eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Implications for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. *Environmental Science & Technology* 53 (15): 8776–84.

Won-Seok K., e Ihn-Sil K., 2022. EDCs trigger immune-neurotransmitter related gene expression, and cause histological damage in sensitive mud crab *Macrophthalmus japonicus* gills and hepatopancreas. *Fish & Shellfish Immunology* 122:484–94.

Xie J., Zhao N., Zhang Y., Hu H., Zhao M., e Jin H., 2022. Occurrence and partitioning of bisphenol analogues, triclocarban, and triclosan in seawater and sediment from East China Sea. *Chemosphere* 287:132218.

Yang H., Hou G., Zhang L., Ju L., e Liu C., 2017. Exploring the effect of bisphenol S on sludge hydrolysis and mechanism of the interaction between bisphenol S and α -Amylase through spectrophotometric methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 167:128–35.