



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI

SCIENZE CHIMICHE BIOLOGICHE FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA E MEDICINA
SPERIMENTALE**

XXXVII CICLO

Coordinatore Chiar.ma Prof.ssa Emanuela ESPOSITO

SSD BIOS-06/A (ex BIO/09)

Effetti *in vitro* e *in vivo* dei Prodotti per la “Personal Care” su invertebrati e vertebrati acquatici

Dottorando

Giorgia Zicarelli

Tutor

Chiar.ma Prof.ssa Caterina FAGGIO

Co-Tutor

Dott.ssa Pavla Lakdawala

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del
Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI2014IT16M2OP005)
risorse FSE REACT-EU, Azione IV.4 “Dottorati e contratti di ricerca su tematiche
dell’Innovazione” e Azione IV.5 “Dottorati su tematiche Green”

Anno Accademico 2023/2024

Riassunto	Pag. 1
Capitolo 1 - Introduzione	Pag. 4
Capitolo 2 - Organismi modello	Pag. 18
2.1 Invertebrati	Pag. 18
2.2 Vertebrati	Pag. 30
Capitolo 3 - Materiali & Metodi	Pag. 56
Capitolo 4 - Risultati	Pag. 79
4.1. Risultati esposizione al PVA	Pag. 79
4.2 Risultati esposizione al BIT	Pag. 91
4.3 Risultati esposizione al PEG	Pag. 97
4.4 Risultati esposizione al SLS	Pag. 111
4.5 Risultati esposizione al Quaternium-15	Pag. 123
Capitolo 5 - Discussione	Pag. 139
Capitolo 6 - Conclusioni	Pag. 174
7. Bibliografia	Pag. 177

Riassunto

L'aumento demografico esponenziale, verificatosi negli ultimi decenni, ha determinato un aumento dell'attività agricola e industriale che, a sua volta, ha portato a un incremento nella richiesta e nella produzione. Tali incrementi sono la ragione dello sversamento, all'interno degli ecosistemi, di tonnellate di sostanze (xenobiotici) di origine naturale o sintetica che ad oggi rappresentano uno dei problemi principali per la salute umana ed ambientale.

Annualmente, infatti, sono oltre 15.000 gli xenobiotici che raggiungono i bacini idrici e di questi, circa 3000 vengono classificati come contaminanti emergenti (ECs): sostanze che non manifestano uno standard per la salute rappresentando, pertanto, una minaccia potenziale o reale per l'ambiente e per l'uomo. Nella grande categoria degli ECs sono rientrati dal 2007 anche i prodotti farmaceutici e per la cura della persona (PPCPs) la cui presenza nei comparti acquatici è aumentata in particolar modo al seguito della pandemia da COVID-19.

In merito alla categoria dei PPCPs, la letteratura scientifica ha concentrato il suo sforzo sull'implementazione delle conoscenze degli effetti che l'accumulo di farmaci ha sulle comunità ambientali e sull'essere umano. Ciò ha portato a una maggiore regolamentazione con leggi più definite e stringenti. Tale sforzo di ricerca scientifica, però, non è riflesso nei prodotti per la cura della persona (PCPs) che spesso presentano leggi poco precise, contraddittorie tra gli Stati e un conseguenziale minore controllo sulle immissioni ambientali e sugli effetti su specie e uomo.

Nonostante le scarse conoscenze e le informazioni contrastanti, il mercato dei PCPs è un mercato in crescita con una spesa annua proiettata a passare dai circa 483\$ miliardi registrati nel 2020 ad oltre 785\$ miliardi nel 2025. La maggiore spesa comporterà, altresì, il maggior accumulo nelle acque delle loro componenti di scarto che non degradate dai sistemi di depurazione continueranno ad interagire con le specie non bersaglio con effetti sconosciuti.

Alla luce di tale scenario, lo scopo del presente lavoro di dottorato è stato quello di andare a valutare i potenziali effetti tossici che cinque composti chimici (Alcol Polivinilico, Benzisotiazolinone, Glicole Polietilenico, Laurilsolfato di Sodio e Quaternium-15), selezionati al seguito di un'attenta ricerca bibliografica in quanto comunemente presenti o di nuova introduzione all'interno delle formulazioni dei PCPs, hanno su organismi modello invertebrati (*Mytilus galloprovincialis*; *Pinctada imbricata*) e vertebrati (*Cyprinus carpio*; *Danio rerio*; *Xenopus laevis*). Come per le sostanze, la scelta delle specie modello è stata effettuata, al seguito di ricerca bibliografica, per diverse loro qualità fra cui: essere buoni bioindicatori, essere comuni fonti alimentari e per la condivisione (*D. rerio* e *X. laevis*) di parte del loro patrimonio genetico con l'essere umano. Inoltre, ulteriore scopo del lavoro è stato quello di tentare di proporre possibili soluzioni all'inquinamento da PCPs mediante la conduzione di analisi che vedevano l'impiego di nutraceutici naturali.

La valutazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di test *in vitro* ed *in vivo* con esposizioni di tipo acuto e subcronico atte ad analizzare la citotossicità e la embriotossicità dei composti selezionati.

Attraverso lo studio della vitalità cellulare, della regolazione del volume cellulare decrescente, l'attività di fagocitosi e l'osservazione di stress ossidativo valutate sugli organismi invertebrati, si è potuto appurare come i composti chimici utilizzati provocavano alterazioni significative, rispetto ai gruppi di controllo, in almeno uno dei test condotti a sottolineare gli effetti più o meno negativi della presenza in ambiente dei PCPs in questione.

I danni osservati nel *M. galloprovincialis* sono apparsi, però, essere limitati quando gli esemplari sono stati esposti sia all'inquinante che al nutraceutico naturale a supporto dell'ipotesi iniziale degli effetti benefici dati dall'inserimento di prodotti di origine naturale nelle formulazioni dei PCPs.

Alla stessa maniera, i test di embriotossicità sui vertebrati hanno fatto registrare significatività negative, rispetto ai gruppi di controllo, al seguito dell'esposizione agli agenti chimici in questione. Gli embrioni, infatti, hanno presentato tassi di mortalità elevati, modificazioni nei tassi di schiusa, comparsa di malformazioni, variazioni della frequenza cardiaca e cambiamenti nella lunghezza media in maniera più o meno marcata nelle diverse concentrazioni scelte.

I risultati ottenuti dal presente lavoro, e di seguito riportati in dettaglio, confermano ed evidenziano le scarse conoscenze che abbiamo in materia di PCPs e delle ricadute che la continua immissione delle loro componenti hanno sull'ambiente e sulla salute umana. Inoltre, pone l'attenzione sulla possibilità di integrare con successo all'interno dei PCPs, qualora non fosse possibile la completa sostituzione delle sostanze in questione, prodotti più "verdi" con lo scopo di andare a contrastare l'effetto dei potenziali inquinanti prevenendo e salvaguardando il benessere degli ecosistemi.

I dati di seguito presentati vanno ad arricchire la scarsa letteratura in materia di PCPs, sottolineando quanto sia imperativo continuare la ricerca al fronte della quantità di prodotti dalle composizioni innovative che giornalmente entrano nel mercato raggiungendo l'ambiente. Solo analisi più dettagliate potranno, infatti, portare alla completa salvaguardia ambientale e umana.

1. Capitolo 1 – Introduzione

1.1 I contaminanti emergenti (ECs), perché rappresentano un problema?

Una delle problematiche principali a livello mondiale per la salute umana e ambientale è legata all'inquinamento delle acque. Esso è spesso causato dall'introduzione di prodotti di origine artificiale o organica derivati da agricoltura, industrie, ospedali o da rifiuti di derivazione domestica (Khandale et al., 2018). Molte delle sostanze di natura organica sono già normalmente presenti negli ecosistemi in parti per trilione o ng/L, oppure in parti per miliardo o µg/L (Rodriguez-Narvaez et al., 2017) ma, quando esse divengono xenobiotici, gli effetti che la loro presenza ha sulle comunità naturali risultano essere poco conosciuti o del tutto sconosciuti. Nello specifico, con il termine di xenobiotici l'Agenzia Europea per l'Ambiente (EEA) fa riferimento a tutte le sostanze che non sono comunemente presenti nell'ambiente e pertanto possono rappresentare un fattore di rischio. L'aumentare della popolazione mondiale, l'espansione agricola ed industriale, hanno di fatto portato ad avere oltre 15.000 sostanze estranee che annualmente entrano in natura diventando possibili nuove fonti di inquinamento (Kucherenko et al., 2021; Kumar et al., 2022).

Tra queste, oltre 3000 sostanze chimiche vengono classificate sotto il nome di Contaminanti Emergenti (ECs), o inquinanti emergenti, definiti dall'Agenzia per la Protezione Ambientale (EPA) americana come: *“composti chimici o materiali che, a causa di una recente fonte d'origine o a causa di un nuovo percorso di sviluppo, non presentano standard per la salute potendo causare una minaccia reale o potenziale all'ambiente o alla salute umana”* (Gabriel et al., 2012). Anni prima il Servizio Geologico degli Stati Uniti definiva gli ECs come: *“composti chimici naturali, sintetici o qualsiasi microorganismo che non sono comunemente monitorati negli ecosistemi, ma che possono potenzialmente entrarvi causando effetti conosciuti o sospetti a livello ecologico o sulla salute umana.”* Andando ad includere

nella definizione successivamente data dall'EPA la specifica sul fatto che negli ECs potessero entrare a far parte non solo composti di origine naturale e sintetica, ma anche eventuali microorganismi, dicitura in seguito eliminata (Smital et al., 2008).

Classificati come pseudo-persistenti in natura, gli ECs, risultano essere difficili da smaltire completamente negli impianti di acque reflue mediante l'utilizzo dei convenzionali trattamenti di pulizia. Questo è dovuto al fatto che molti prodotti di scarto non sono inclusi nelle attuali legislazioni in materia di acque reflue (Direttiva 2000/60/EC; Direttiva 2008/56/EC; Direttiva 2013/39/EU) causando da parte di tali impianti la capacità di eradicare meno del 25% degli xenobiotici immessi al netto di uno scarico annuale intorno ai 1500 km³ (Li & Zhang, 2011; Kumar et al., 2022; Puri et al., 2023). Questo ha portato, fin dal 1990, a un considerevole interesse riguardo al possibile inquinamento delle acque da parte dei ECs (Chavoshani et al., 2020).

Per la loro sempre maggiore presenza sulle superfici d'acqua - sia esse dolci che salate - l'Unione Europea (EU) ha sancito negli anni 2000 la prima lista di sostanze chimiche che dovevano essere rimosse poiché considerate inquinanti (Hena et al., 2021). Risultata essere pioneristica nell'approccio, in quanto per la prima volta si delineavano delle strategie contro l'inquinamento delle acque (Homem et al., 2022), a questa lista inizialmente afferivano 33 composti chimici la cui presenza, ad oggi, è comprovata in tutti i comparti biotici quali: acqua (compresa l'acqua potabile), suolo e aria, in diverse aree del mondo come: Stati Uniti, Europa ma anche Giappone o Cina (Gabriel et al., 2015; Sui et al., 2015; Zhao et al., 2016). Dal 2007, in questo gruppo, sono entrati a far parte anche i prodotti farmaceutici e per la cura personale classificati sotto la sigla generica di PPCPs (Hena et al., 2021; Priya et al., 2022).

I Prodotti farmaceutici e per la cura personale (PPCPs) come contaminanti emergenti

L'incremento dell'utilizzo giornaliero di PPCPs da parte della popolazione e le capacità di bioaccumulo e magnificazione biologica rendono ormai impossibile ignorare il problema (Zenker et al., 2014). Anche in questo caso, i comuni impianti di acque reflue sono risultati essere non consoni a una loro corretta rimozione che, pertanto, permangono nell'acqua entrando nell'ambiente (Porter et al., 2020). I livelli di concentrazione di tali composti all'interno dei compartimenti ambientali sono estremamente variabili da un continente ad un altro, da un paese ad un altro, ma anche da una regione all'altra tanto che una stessa sostanza può passare da concentrazioni di ng/L ad anche g/L (Morin-Crin et al., 2022; Riva et al., 2018). Un esempio di tale variabilità è riportato nel lavoro di Fekadu et al., (2019) che compara i livelli di inquinamento da prodotti farmaceutici sulla superficie delle acque africane ed europee. Nel lavoro Fekadu et al., (2019) riporta che la massima concentrazione ritrovata in Africa, per le medesime sostanze analizzate, era 20.000 volte maggiore rispetto a quella riscontrata in Europa.

L'introduzione dei PPCPs negli ecosistemi avviene tramite diversi meccanismi come, ad esempio, gli impianti di acque reflue o le grandi fattorie, che sono state individuate come la principale fonte di scarico di ECs all'interno dei bacini idrici (Barooah et al., 2023). La presenza nei comparti acquatici dei PPCPs è, poi, incrementata ulteriormente negli ultimi anni anche e soprattutto al seguito della pandemia COVID-19 che ha portato non solo all'accumulo di PPCPs all'interno degli ecosistemi ma, anche, all'osservazione dell'aumento della loro percentuale all'interno dei tessuti di organismi non-bersaglio con effetti tossicologici poco conosciuti o del tutto sconosciuti. La mancata conoscenza degli effetti di tali composti rappresenta, così, una minaccia per la sopravvivenza delle comunità e degli ecosistemi oltre che per la salute umana

quando bioaccumulati da specie comunemente presenti all'interno della dieta (Gerstell et al., 2020; Piwowarska & Kiedrzyńska, 2022). Gli esseri umani e gli animali, infatti, processano le sostanze usate soprattutto nella formulazione dei farmaci a diversi gradi; in alcuni casi l'essere umano può assorbire e ingerire il 95% del principio attivo e in altri solo il 5% (Barooh et al., 2023). I PPCPs anche se a basse concentrazioni presentano metaboliti biologicamente attivi che possono essere dannosi per le comunità non bersaglio tanto da essere individuati come distruttori endocrini o, in alcuni casi, come cancerogeni (Ebele et al., 2017; Priya et al., 2022). Ad oggi, di tutta la letteratura riguardante i PPCPs, la stragrande maggioranza pone la propria attenzione sugli effetti che i diversi farmaci hanno sulle specie non bersaglio, sull'essere umano e sull'ambiente. Al contrario, solo il 15% di questi lavori si focalizza nell'indagare sulla reazione data dall'immissione sempre più costante di prodotti per la cura della persona (Homem et al., 2022).

1.2 I prodotti per la cura personale e la loro problematica (PCPs)

Con l'avvento del XXI secolo, ad incrementare notevolmente la qualità della vita quotidiana sono stati i PCPs. Sostanze, a stretta correlazione con i farmaci, prescrittibili e non prescrittibili, che ricoprono scopi per la cura individuale (Gogi et al., 2018). Con il termine di PCPs si fa riferimento, infatti, a un grande categoria di articoli contenenti all'interno della loro composizione un gran numero di composti chimici sintetizzati in laboratorio (Montes-Grajales et al., 2017). Essi sono usati per il raggiungimento di vari obiettivi quali: nutrizione (nel caso di capsule e compresse di vitamine o sali minerali), pulizia, miglioramento dell'apparenza fisica e miglioramento della salute individuale proteggendo così da varie malattie (Shaaban & Alhajri, 2020). Quando parliamo di PCPs i principali sono: paste dentifricie, creme solari (filtri UVs), creme viso e creme corpo, schiume da barba, profumi sintetici, detergenti, cosmetici,

shampoo, ecc. (Yang et al., 2017). Spesso i PCPs sono descritti come cosmetici dalla parola greca “kosmetikos” che significa “per abbellire” (Barooah et al., 2023). Storicamente, perciò, i PCPs sono da sempre stati utilizzati. Molte popolazioni considerate anche “primitive” come gli indiani d’America utilizzavano prodotti per la cura dei capelli; altre tribù africane utilizzavano l’argilla come protezione del cuoio capelluto e tante altre culture utilizzavano il trucco al fine di accrescere il loro fascino. A queste piccole accortezze estetiche si aggiungevano anche quella legata all’igiene personale che i primi uomini presero dalla diretta osservazione degli animali. Tale pratica ha portato alla costruzione di veri e propri bagni pubblici già ai tempi degli antichi greci e romani. In questi luoghi sia le persone di ceto elevato che quelle di ceto più modesto e povero potevano prendersi cura del proprio corpo (Aliverti, 2023).

Da una prospettiva globale e scientifica la definizione che si attribuisce ai PCPs è ancora non del tutto chiara portando all’insorgere di inaccuratezze o incomprensioni. Ad esempio, le creme solari nell’EU vengono classificate come PCPs, mentre negli Stati Uniti fanno parte dei farmaci da banco; le tinture per capelli rientrano nei PCPs in EU e nei quasi-farmaci in Giappone (Nohynek et al., 2010). In generale, in accordo con la regolazione europea sulla sicurezza dei PCPs introdotta nel 1976 e periodicamente aggiornata (EU, 2007), i PCPs sono *“sostanze o preparazioni che entrano in contatto con diverse zone esterne del corpo umano (epidermide, unghie, capelli, labbra, genitali esterni), con i denti o le membrane mucose della cavità orale con lo scopo esclusivo di pulirle, profumarle, cambiarne il modo in cui appaiono, proteggerle o mantenerle in buone condizioni.”* La definizione che il governo statunitense dà ai prodotti per la persona è abbastanza simile a quella data dall’EU in quanto li definisce come *“articoli da strofinare, versare, cospargere o applicare sul corpo umano o su una parte di esso con lo scopo di pulirlo, abbellirlo, promuoverne l’attrattività e alternarne l’aspetto.”* Includendo, inoltre, *“articoli il cui fine è entrare a far parte come componente dei PCPs escludendo da tale termine il sapone”* (Nohynek et al., 2010). In aggiunta, alcuni PCPs possono avere la doppia definizione di farmaci e

cosmetici, questo è dovuto alla doppia valenza di prendersi cura del corpo da un punto di vista estetico e medico; alcuni esempi sono gli shampoo antiforfora il cui scopo non è solo quello di pulizia del capello ma anche quello di prevenire la comparsa della forfora, oppure le paste dentifriche contenenti fluoro o i deodoranti antitraspiranti (Khalid & Abdollahi, 2021).

Il mercato odierno ed il consumo giornaliero dei Prodotti per la cura personale (PCPs)

Nel 2012, l'ufficio statistico del lavoro americano contava una spesa annua in PCPs di circa 750\$ per famiglia (US Bureau of Labor Statistics, 2014). Mentre oggi, in generale, si conta che il mercato globale di vendita di PCPs, in particolare prodotti nell'ambito della cosmesi, abbia fatto incassare un totale di 483\$ miliardi nel 2020 e che tale tendenza possa raggiungere l'incasso globale di 785\$ miliardi entro il 2025 (Falcone et al., 2024). Dopo la pandemia da COVID-19 mondialmente è cresciuta la richiesta da parte del consumatore di prodotti più sicuri, salutari e puliti (Kumar et al., 2021). Il mercato mondiale dei PCPs è diviso in quattro diverse categorie: cosmetici, cura della pelle, cura personale e profumi; tra questi, nel 2022, il 45% del fatturato globale era dato dalla vendita di cosmetici e per il 29% da quella dei prodotti per la cura della pelle (Statista, 2023), nel 2023 tale percentuale è salita al 33.7% per i prodotti per la cura della pelle. Fra il 2024 e il 2030 l'andamento del mercato dei PCPs prevede una crescita del 7.7% (Figura 1) rispetto alla crescita registrata sino al 2023 (Grand View Research, 2023). Focalizzandoci sull'Italia, il fatturato globale di esportazioni in fatto di cosmesi si è accresciuto del 18.5% con una crescita in relazione al mercato globale di 12.5 punti percentuali. In generale, il valore di domanda di cosmetici in Italia ha raggiunto e superato i livelli pre-pandemici in tutti quei settori fortemente penalizzati. Un esempio è dato dalla vendita di prodotti di profumeria le cui fragranze erano state

poco utilizzate durante la pandemia da COVID-19. Fra i PCPs ad essere maggiormente consumati dalle famiglie italiane sono i prodotti per la cura della pelle (Cosmetica Italiana, 2023). A livello europeo nel 2022, il primato di vendita e consumi di PCPs è detenuto da Germania e Francia con percentuali del 25.7% sul totale per le vendite legate a prodotti per la cura della pelle (in particolare viso e corpo), seguito dalla vendita di prodotti per l'igiene personale che hanno venduto il 21.7% del totale (Statista, 2023).

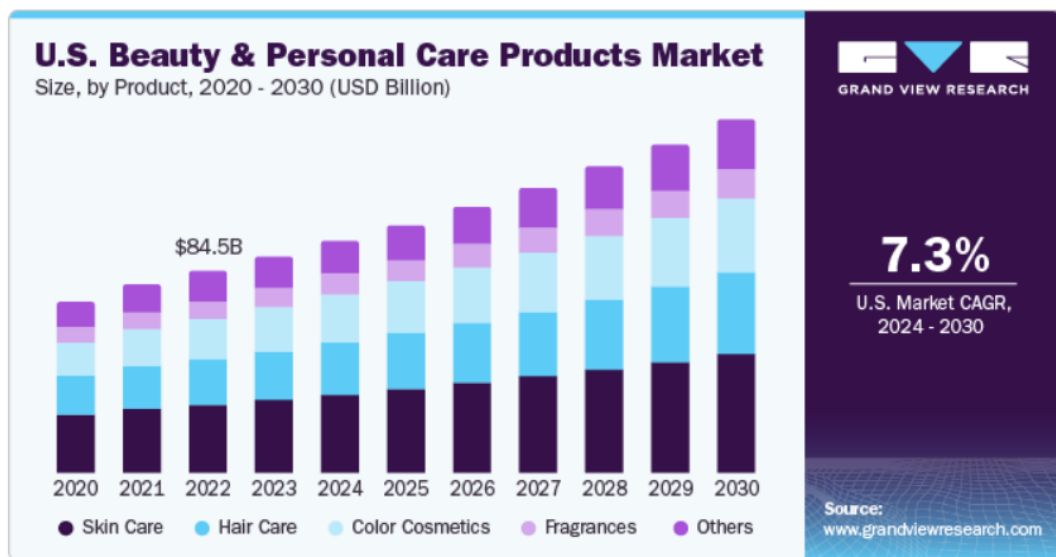


Fig. 1. Proiezione della crescita della vendita dei prodotti per la cura della persona dal 2020 al 2030 fornita dalla Grand View Research.

La vendita di PCPs è influenzata dall'etnia e dal luogo in cui una persona vive assecondando le esigenze del consumatore. Ad esempio, gli afroamericani trattano in maniera differente i loro capelli rispetto agli asiatici e pertanto li lavano e utilizzano balsami meno frequentemente; alla stessa maniera nelle comunità asiatiche l'utilizzo di prodotti per la cura della pelle è maggiore rispetto al resto del mondo (Bennett et al., 2010).

Oggigiorno, circa il 60% della popolazione riconosce i prodotti usati convenzionalmente per l'igiene come non sicuri e circa il 92% dei consumatori ha richiesto linee guida rigorose per gli ingredienti che possono essere utilizzati nei PCPs di origine sintetica (Persistence Market Research, 2020). Inoltre, circa l'80% delle donne in età universitaria non sa se i PCPs utilizzati sono liberi da prodotti come ftalati. Il 48.6% delle persone analizzate non è certo che i PCPs da loro utilizzati possano ritenersi sicuri (Khalid et al., 2021). Tuttavia, il mercato di tali prodotti resta alto per via della formulazione dei PCPs convenzionali che li porta ad avere un costo minore rispetto ai più "sicuri" prodotti di origine organica. In alcuni contesti, i PCPs convenzionali contengono ancora percentuali di ingredienti petrolati che possono essere dannose per l'ambiente e la fauna selvatica, ma anche per la pelle. Tale andamento è favorito dall'acquisto di PCPs presso supermercati o ipermercati, invece che negozi specializzati, poiché luoghi vicini ai centri residenziali che forniscono un vasto numero di prodotti (Gran View Research, 2023). A questi dati si aggiungono quelli legati alle prescrizioni dermatologiche che, approssimativamente, contengono nel 30% e 40% dei casi un prodotto che rientra fra i PCPs. In generale, però, gli individui nell'arco delle 24h utilizzano come minimo un PCPs (Hart et al., 2019). I cosmetici sono i prodotti che contengono il più alto quantitativo di ECs considerati come dannosi, a seguire vi sono le protezioni solari con i filtri UVs e i repellenti per insetti e disinfettanti (Montes-Grajales et al., 2017).

Composti chimici contenuti nei Prodotti per la cura personale (PCPs) e i loro effetti sull'ambiente

Per definizione non tutti i PCPs sono considerati essere persistenti nell'ambiente, ma il loro continuo rilascio all'interno degli ecosistemi e la loro diffusione, sicuramente più rapida rispetto alla capacità di rimozione ambientale, li rende composti classificati

come pseudo-persistenti ed in grado di interferire con l'ecosistema acquatico alterando il sistema riproduttivo e il normale sviluppo delle varie specie (Ebele et al., 2017). Questa problematica è avvalorata dal fatto che le informazioni sulla composizione dei PCPs risultano essere mancanti rendendo impossibile fare una corretta selezione dei prodotti da utilizzare che, pertanto, vengono immessi in ambiente con frequenza (Khalid et al., 2021).

Basti pensare che fino a non troppi anni fa sostanze come triclocarbon, triclosan e parabeni erano comunemente utilizzati per la formulazione dei PCPs come conservanti o antimicrobici nella composizione di prodotti come paste dentifrice, saponi, deodoranti e detergenti. Mentre, sostanze come octocrylene o oxybenzone erano comunemente impiegate come filtri UV all'interno delle creme solari o dei prodotti contenenti protezione contro i raggi solari.

Entrando più nello specifico, il Triclocarbon (N-(4-chlorophenyl) -N'-(3,4-dichlorophenyl)urea, TCC) e il Triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol, TCS), rispettivamente introdotti sessant'anni e cinquant'anni fa nella formulazione dei PCPs (Asimakopoulou et al., 2016; Yueh & Tukey, 2016), e spesso nominati insieme a causa delle loro proprietà antimicrobiche e antifungine, hanno incrementato la loro frequenza di rinvenimento al seguito della pandemia da COVID-19 (Catalano et al., 2021; Usman et al., 2020). Sebbene l'EU abbia approvato una concentrazione pari e non superiore allo 0.2% di TCC all'interno dei prodotti, ne ha vietato la presenza all'interno di materiali che entrano a contatto con il cibo (Chaudhari et al., 2018; European Commission, 2005; 2020; Musee, 2018); allo stesso tempo la FDA ha vietato dal 2016 il TCS all'interno di prodotti da banco per il lavaggio come saponi o schiume (FDA, 2016). Tuttavia, la presenza di queste sostanze è ancora ammessa all'interno dei PCPs con una concentrazione di TCC pari anche all'1.5% del prodotto e quella del TCS pari al 0.3% nei prodotti di EU, USA, Canada e Cina e di 0.1% in Giappone (Wang & Liang, 2021). In ugual misura, ancora oggi, tanti altri paesi "sviluppati" come la Norvegia non

hanno ancora regolamentazioni per la concentrazione minima ammissibile nei PCPs di tali composti. Questo ampio utilizzo ha portato ad aver rivelato le sostanze all'interno dei compartimenti idrici in varie aree del mondo dalle acque marine e dolci fino al raggiungimento delle acque potabili. Le concentrazioni rilevate variano dai ng/L fino anche ai mg/L in relazione alla capacità di eliminazione del composto dagli impianti di trattamento di acque reflue nel mondo (Dar et al., 2022; Iacopetta et al., 2021; Yun et al., 2020). La sempre maggiore presenza di TCC e TCS e l'aumentare dei rilevamenti all'interno del comparto acquatico, ha condotto gli studiosi ad interessarsi ai possibili effetti che un accumulo massiccio di questi due agenti antimicrobici avesse nell'ambiente. Quel che è emerso è che il TCC a concentrazioni ambientali rilevanti causa accumulo in piante e animali per via della sua lipofilità (Yun et al., 2020), genotossicità nei pesci di acqua dolce (Villeneuve et al., 2017), può causare stress ossidativo in *Danio rerio* (Wei et al., 2018) e colpire animali di piccole dimensioni come i crostacei *Daphnia similis* ed *Eisenia andrei* (Albaenese et al., 2017; Satyro et al., 2017). L'accumulo del TCC è stato, inoltre, trovato all'interno del sangue umano e dell'urina in concentrazioni di ng/mL (Ye et al., 2011). Nella stessa maniera i test condotti sul TCS hanno fatto emergere come tale antimicrobico presenta effetti tossici su diversi organismi acquatici dalle piante agli invertebrati fino ai vertebrati (Dar et al., 2022). Tra i principali effetti osservati vi sono quelli sull'invertebrato *Mytilus galloprovincialis* su cui è stata osservata una destabilizzazione delle membrane lisosomiali al seguito dell'esposizione al TSC (Canesi et al., 2007), e nei vertebrati è stata osservata la riduzione del tasso di sopravvivenza nella trota iridea, *Oncorhynchus mykiss* (Yueh & Tukey, 2016) ed il ritardo nella schiusa o l'alterazione dello sviluppo di organi con la conseguenziale comparsa di malformazioni a carico della colonna vertebrale, comparsa di edema pericardici o alterazione della lunghezza del corpo dell'animale risultato essere più corto rispetto al normale sviluppo di individui non esposti a TSC (Hallare et al., 2005; Oliveira et al., 2009). Da un punto di vista biochimico, inoltre, si è

osservato come un'esposizione al TSC può causare stress ossidativo nell'attività degli enzimi detossificanti, antiossidanti, metabolici e neurologici (Paul et al., 2020) evidenziando come una parziale, o inesistente, regolamentazione globale di sostanze potenzialmente dannose porta a degli effetti ancora non del tutto conosciuti per la flora e la fauna mondiale. Effetti che si ripercuotono di conseguenza anche sulla salute umana che di tali prodotti ne fa consumo.

In maniera analoga i filtri UV inseriti all'interno di creme solari e PCPs, il cui scopo è schermare dal sole, hanno una più facile via di arrivo nell'ambiente acquatico in quanto spesso la loro presenza è stata registrata in campioni di acqua prelevati in aree ad alta balneazione. In aggiunta all'inefficienza – anche in questo contesto – degli impianti di ripulita di acque reflue, come per i sopra citati agenti antimicrobici, la percentuale rilevata all'interno delle acque può variare su base stagionale in differenti aree geografiche da ng/L a mg/L (Carve et al., 2021). Fra i filtri UV di origine organica maggiormente utilizzati sveltano l'octocrylene (2-ethylhexyl 2 cyano-3,3-diphenyl acrylate - OCT) e l'oxybenzone [(2-hydroxy-4-methoxyphenyl) - phenylmethanone; o semplicemente benzophenone-3 BP-3] entrambi rientrati nei 29 filtri UV ammessi dall'UE all'interno dei prodotti cosmetici (EC, 2021). Iniziato ad utilizzare all'interno delle creme solari come filtro UV, l'OCT oggi giorno è presente nella composizione di PCPs per la cura della pelle ad uso giornaliero o come stabilizzatore di altri filtri UV (Duis et al., 2022) con una concentrazione ammessa da parte della Commissione Europea, dall'Agenzia per gli Alimenti e i Medicinali Americani (FDA) e dall'Associazione della Nazioni del Sud-Est Asiatico (ASEAN) pari al 10% (Bury et al., 2023). Per quanto concerne il BP-3 esso è contenuto in circa l'81% dei PCPs americani e cinesi (Scheele et al., 2023) ed è regolamentato con percentuali del 6% negli Stati Uniti dalla FDA e in Unione Europea (EC, 2017; Scheele et al., 2023).

Come per il TCC e il TSC sopra menzionati, le alte percentuali di ammissibilità e la grande presenza in ambiente ha spinto gli studiosi ad interessarsi a queste due

sostanze e ai loro possibili effetti sulle comunità non-bersaglio. È emerso che l'OCT è stato trovato in campioni di suolo e di piante, come anche di aria e acqua oltre che ambienti marini (Díaz-Cruz et al., 2012; Lyu et al., 2022; Pegoraro et al., 2020), mentre il BP-3 è stato trovato in circa l'86% delle acque salate e dolci – la cui maggior concentrazione è stata registrata in Norvegia (Langford et al., 2015), con una percentuale del 95% negli effluenti di acque reflue (Zhong et al., 2020) e in diversi organismi acquatici (Huang et al., 2021). I principali effetti osservati a livello di specie non-bersaglio sono stati: l'alterazione di diversi geni legati alle funzioni endocrine di danio zebra (Sun et al., 2016), ridotta fecondità con aumenti dei livelli vitellogenici nel pesce del riso, *Oryzias latipes* (Yan et al., 2020), variazione nell'espressione delle Heat Shock Protein (Hsp70) negli embrioni (Ozáez et al., 2016), ed è stato osservato il ritiro dei polipi nei coralli *Pocillopora damicornis* e *Seriatopora caliendrum* (He et al., 2019) e l'alterazione nell'efficienza delle zooxantelle presenti in *Stylophora pistillata* quando esposte a una concentrazione elevata di tale filtro UV (Fel et al., 2019). Sicuramente, però, effetti ancor più negativi sono stati evidenziati quando gli animali venivano esposti a concentrazioni di BP-3. Di fatti, l'oxybenzone ha causato morte, diminuzione della schiusa e malformazioni nelle prime fasi di sviluppo del pesce zebra (Balázs et al., 2016), alterazione nel metabolismo di *Sercostoma vittatum* con riduzioni nell'attività alimentare, nei livelli di carboidrati e in quelli di glutazione (Campos et al., 2017), alterazione nell'espressione di alcuni geni legati all'ormone del sesso con diminuzione della produzione di uova del pesce del riso giapponese (Kim et al., 2014) e danni al DNA di *Poecilia reticulata* e *S. pistillata* (Dos Santos-Almedia et al., 2019; Downs et al., 2016). Sono proprio i danni alle barriere coralline il principale focus degli studi sui filtri UV. Tali sostanze, infatti, contribuiscono allo sbiancamento dei coralli (bleaching), fenomeno in cui le zooxantelle si allontanano dal corallo andando a distruggere la simbiosi, provocando zooxantelle con infezioni virali latenti e un effetto negativo sui polipi (Duis et al., 2022). Tale importante dato ha portato alla messa al bando

dell'Octocrylene presso la Repubblica di Palau e le Isole Vergini Americane rispettivamente nel gennaio 2020 e nel marzo 2020, alla proibizione dell'Oxybenzone nella Repubblica di Palau, nelle Isole Vergini Americane e ad Aruba nel 2020, nel Bonaire, a Key West (Florida) e alle Hawaii dal 2021 (Miller et al., 2021).

Per quanto sostanze come il triclosan, l'ortocrylene e l'oxybenze siano ancora ammesse in certe percentuali all'interno dei PCPs europei, in totale sono circa 800 le sostanze ad oggi proibite o che hanno ricevuto restrizioni da parte dell'Unione Europea, un numero molto elevato se si considera che negli Stati Uniti il numero di sostanze proibite o con restrizioni è solo di 11 (Barooah et al., 2023; Chavoshani et al., 2020; Feinstein & Collins, 2018).

1.3 Scopo del lavoro

Dai dati precedentemente esposti, risulta ormai chiaro come i PCPs siano entrati a far parte del quotidiano delle persone andandone a migliorare di gran lunga la qualità ma, allo stesso tempo, risulta altresì evidente come “comune” non sempre sia sinonimo di sicuro per l'ambiente, in cui i rifiuti dei prodotti finiscono, per le comunità che vi vivono e per l'essere umano. Spesso, infatti, sono proprio le sostanze chimiche più comunemente utilizzate nella composizione dei PCPs, il loro inadeguato smaltimento e il loro accumulo nei vari compartimenti ambientali a farli diventare gli ECs di maggior rischio. Inoltre, il continuo interesse da parte delle comunità verso PCPs più “verdi” porta alla continua formulazione di nuovi composti chimici i cui effetti una volta raggiunto l'ambiente risultano essere ancora pressoché sconosciuti.

Per questo, lo scopo del seguente lavoro, nell'ambito del Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-20 (CCI 2014IT16M20P005), risorse FSE REACT-EU, Azione IV. 5 “Dottorati su tematiche Green”, è stato quello di analizzare i potenziali effetti tossici che cinque comuni (o di nuova introduzione) composti chimici utilizzati per la formulazione di diverse tipologie di PCPs (Alcol Polivinilico,

Benzisotiazolinone, Glicole Polietilenico, Lauilsoflato di Sodio e Quaternium-15) hanno su differenti organismi modello invertebrati (*Mytilus galloprovincialis*, *Pinctada imbricata*) e vertebrati (*Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*). I modelli selezionati permettono, infatti, di restituire sia un quadro attendibile degli effetti che si possono osservare in ambiente acquatico, quando le varie specie sono naturalmente esposte a tali sostanze, sia essere modello di possibili effetti dannosi sull'uomo in quanto con l'essere umano, come nel caso di *D. rerio* e di *X. laevis*, ne condividono parte del patrimonio genetico, o risultano essere parte integrante della loro alimentazione come invece accade per *M. galloprovincialis* e *C. carpio*. Scopo del lavoro è stato, infine, quello di tentare di presentare alternative più "verdi" da poter inserire nella formulazione dei PCPs a contrastare gli effetti negativi evidenziati.

2. Capitolo 2 – Organismi modello

2.1 Invertebrati

2.1.1 Molluschi bivalvi

Con il termine “molluschi bivalvi” o lamellibranchi si fa riferimento a una classe di molluschi (Bivalvia) a cui appartengono all'incirca 15.000 specie accumulate fra loro dalla presenza di una conchiglia, composta da due valve reciprocamente articolate, e da branchie lamellari (Castro & Huber, 2011; Westheide & Rieger, 2011). Fra queste, le specie *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, la cozza Mediterranea, e l'ostrica perliera *Pinctada imbricata* (Leach, 1814) vengono utilizzate dalla comunità scientifica come organismi modello per determinare gli effetti che gli xenobiotici hanno sull'ambiente.

Anatomia & Fisiologia

La struttura base di un bivalve è rappresentata dalla conchiglia. Essa è caratterizzata da due differenti valve che sul dorso dell'animale portano una protuberanza che prende il nome di **umbone**, struttura che costituisce la parte primariamente originata della conchiglia dalla quale si formano linee di accrescimento concentriche (Castro & Huber, 2011). Nella parte dorso-mediana le valve sono articolate grazie alla presenza di fossette e dentelli che impediscono il loro slittamento e che prendono il nome di **cerniera**. In base alla specie esistono differenti tipi di cerniera costituite da più o meno dentelli. Le principali sono le seguenti: taxodonte, schizodonte, disodonte, isodonte, eterodonte, pachidonte e desmodonte (Westheide & Rieger, 2011). In alcuni contesti la cerniera può essere priva di dentelli. Oltre che dalla cerniera, le valve sono tenute chiuse da **muscoli adduttori** (Figura 3) che attraversano la conchiglia trasversalmente. In specie come *M. galloprovincialis* il muscolo è regredito mentre in *P. imbricata* risulta

essere ancora molto sviluppato e ben visibile come nella Figura 2E (Castro & Huber; Westheide & Rieger, 2011).

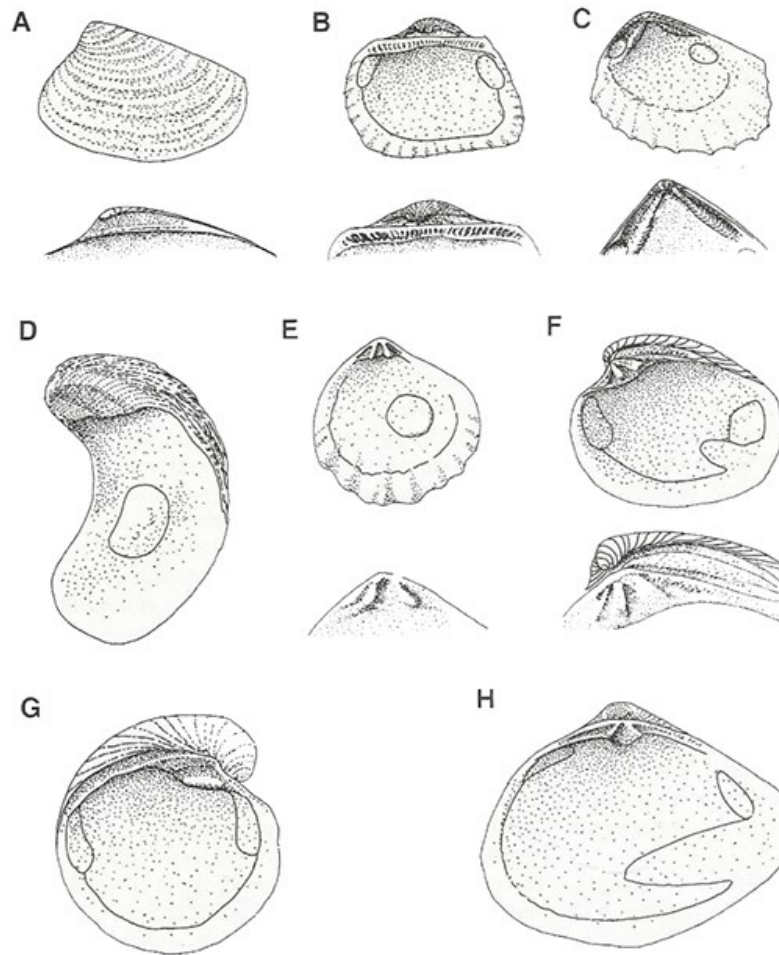


Fig. 2. Esempi di cerniere all'interno dei molluschi bivalvi. Fig. 2A, cerniera priva di dentelli. 2B cerniera taxidonte; 2C cerniera schizodonte; 2D cerniera disodonte; 2E cerniera isodonte; 2F cerniera eterodonte; 2G cerniera pachidonte; 2H cerniera desmodonte. All'interno delle conchiglie vengono inoltre riportate le dimensioni e la posizione dei muscoli adduttori che tengono unite le due valve.

A produrre la conchiglia dei bivalvi è il **mantello**, struttura che ricopre interamente la cavità interna dell'animale e racchiude il corpo molle in un'area denominata cavità del mantello o **palleale** (Castro & Huber, 2011). Di norma, il mantello è costituito da tre pliche: una interna, una mediana (contiene soprattutto gli organi di senso) e quella esterna che secerne la conchiglia (Westheide & Rieger, 2011). Subito sotto il mantello si sviluppano le branchie a pettine che prendono il nome di **ctenidi** (Poli & Fabbri, 2018).

Nella maggior parte dei bivalvi le branchie sono cigliate e filamentose. Esse formano delle lamelle che decorrono dorsalmente alla parete corporea e alla parete del mantello. Gruppi sagittali di ciglia possono, poi, unire i filamenti adiacenti a formare una pseudo-lamina fino ad originare nei bivalvi più sviluppati delle branchie lamellari vere e proprie, Figura 3 (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011).

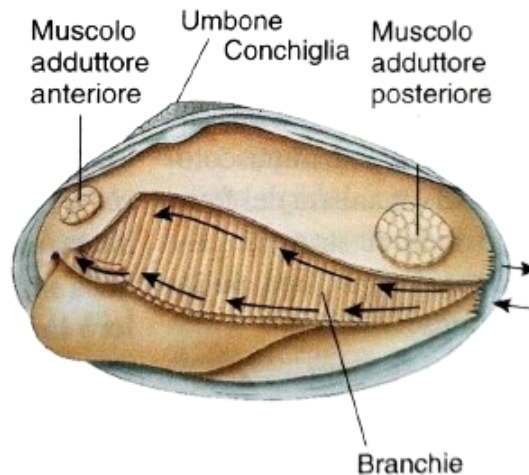


Fig. 3. Tipica struttura interna di un mollusco bivalve in cui sono evidenziate le branchie lamellari con il flusso unidirezionale generato dal movimento delle ciglia e i muscoli adduttori anteriore e posteriore che tengono unite le due valve. Nella parte posteriore della valva è anche riportata la presenza dell'umbone.

Il battito delle ciglia spinge l'acqua attraverso le branchie realizzando un flusso unidirezionale del mezzo esterno (Poli & Fabbri, 2018).

I bivalvi sono specie che presentano un sistema nervoso semplice costituito da tre paia di gangli principali e autonomi. Gli organi sensoriali sono costituiti da statocisti presenti nel **pie**de e osfradi presenti nel canale esalante della cavità palleale in corrispondenza del lato inferiore dell'adduttore posteriore (Westheide & Rieger, 2011).

Il piede svolge principalmente la funzione di ventosa e organo scavo assumendo così varie forme. Al suo interno sono presenti una serie di ghiandole, di cui la più importante è la ghiandola **bissale** in grado di produrre filamenti (**bisso**) che vengono utilizzati da specie di bivalvi come i mitili per ancorarsi a rocce, substrati o ad altri esemplari di bivalve della medesima specie (Castro & Huber, 2011).

Sono animali dotati di un sistema circolatorio semplice. Esso è costituito da un cuore composto da due atrii laterali e un ventricolo che avvolge l'intestino terminale. L'atrio, nel caso dei molluschi bivalvi, presenta delle pareti sottili che raccolgono il liquido circolante refluo, l'**emolinfa**, dai tessuti e dai seni. Il ventricolo, invece, presenta pareti più spesse in quanto contraendosi spinge l'emolinfa alle varie regioni del corpo (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011). L'emolinfa è costituita da differenti specie ioniche tra cui: calcio (di cui l'emolinfa è principale fonte), magnesio, cloro e idrogeno carbonato, potassio e sodio. Inoltre, sempre nell'emolinfa sono presenti soluti organici (inclusi substrati metabolici), proteine e ioni (Curpan et al., 2022). A far variare il volume emolinfatico sono fattori legati all'età, la specie e l'habitat; mentre, a influenzare la composizione dell'emolinfa sono: lo stato di salute dell'animale, dal fotoperiodo a cui è esposto e dalle condizioni fisiologiche dell'individuo (Machalowski & Jesionowski, 2020). Al suo interno possiamo trovare amebociti e granulociti coinvolti nelle funzioni fagocitarie e, nei bivalvi perliferi, come nel caso dell'ostrica perlifera *P. imbricata*, gli emociti sono coinvolti nella formazione della perla (Poli & Fabbri, 2018). Le perle si formano quando l'ostrica inizia a secernere sottili strati di carbonato di calcio intorno a un parassita o una particella estranea che entrano nella conchiglia ponendosi fra il mantello e le valve a livello della madreperla (Castro & Huber, 2011). Il sistema digerente dei bivalvi è caratterizzato dall'assenza di un apparato boccale. La maggior parte delle specie filtra dall'acqua, per mezzo delle branchie, le particelle contenute all'interno del mezzo acquoso (Westheide & Rieger, 2011). Le ciglia degli ctenidi generano una corrente d'acqua che raccoglie le particelle (Poli & Fabbri, 2018). Dalla cavità palleale viene secreto un muco che trasforma le particelle in lunghi cordoni, questi vengono spinti verso il solco alimentare e verso i palpi labiali. Al livello di questa struttura, le particelle alimentari vengono selezionate in relazione alla loro dimensione; i mitili sono in grado di trattenere le particelle la cui dimensione si attesta tra i 7 ai 10 μm , Figura 4 (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011).

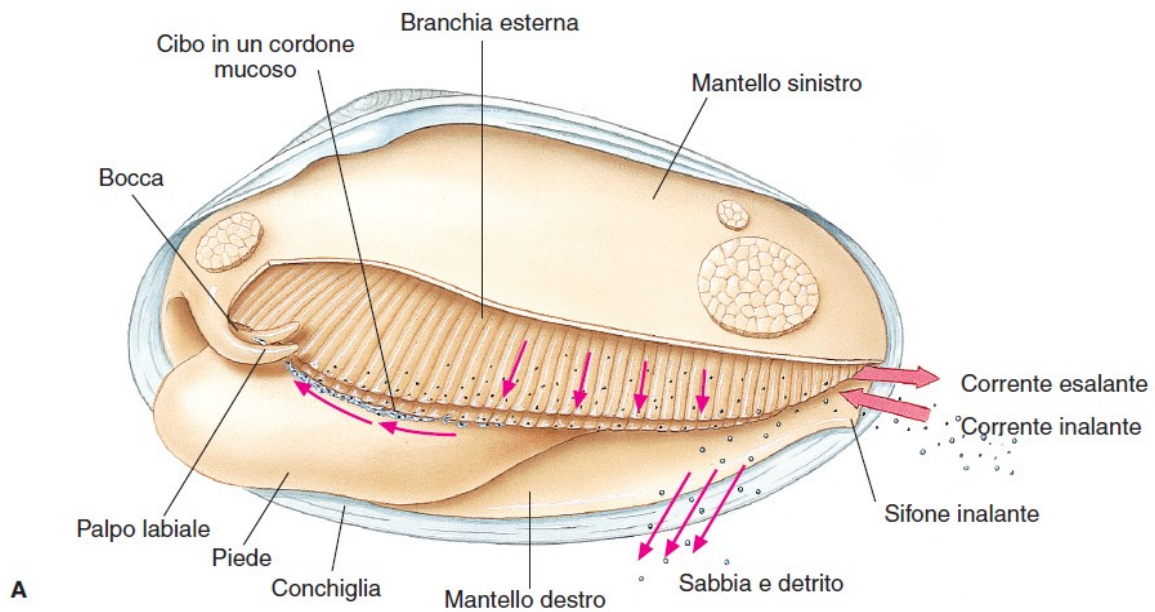


Fig. 4. Rappresentazione grafica del funzionamento dell'apparato alimentare di un mollusco bivalve.

Il breve esofago è collegato allo stomaco, qui sboccano i dotti provenienti dalle ghiandole digestive. Nell'apparato digerente dei bivalvi è presente una struttura che prende il nome di **stilo cristallino** in grado di ruotare, grazie all'azione delle ciglia, contro la parete dello stomaco a sua volta protetta da uno **scudo gastrico** (Figura 5); lo stomaco contiene, inoltre, una regione cigliata con diverticoli digestivi (Westheide & Rieger, 2011).

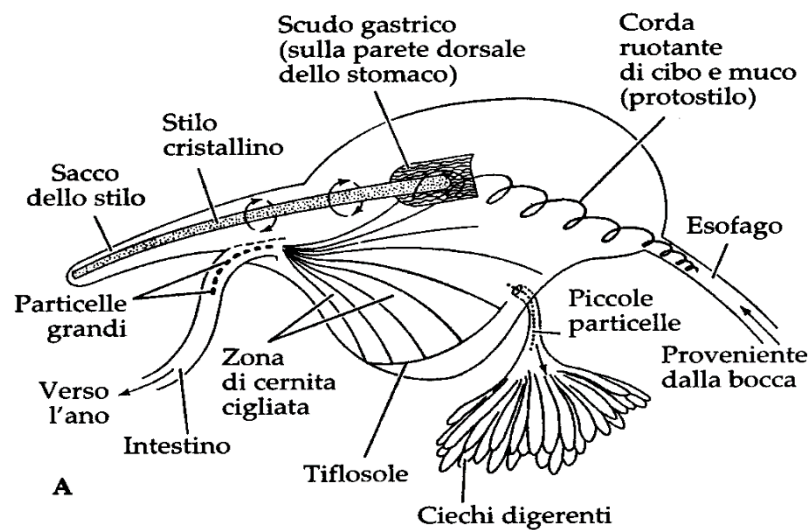


Fig. 5. Rappresentazione grafica dell'anatomia dell'apparato digerente di un mollusco bivalve.

La digestione delle particelle alimentari, da parte dei bivalvi, consta di due momenti: **digestione extracellulare** e **digestione intracellulare**. La prima inizia a livello dello stilo cristallino che, tramite la rotazione sullo scudo gastrico, demolisce meccanicamente le particelle; durante questa fase vengono liberati enzimi digestivi, tra cui le amilasi, che si mescolano alle particelle alimentari. Le pareti gastriche e i diverticoli digestivi secernono enzimi e acidi che abbassano il pH. Una volta avvenuta una prima demolizione da parte degli enzimi, le particelle vengono assorbite dai diverticoli digestivi, che nel complesso formano una **ghiandola digestiva** – impropriamente denominata **epatopancreas** – tramite processi fagocitari. Una volta nei diverticoli digestivi avviene la digestione intracellulare e l'assorbimento. Si andranno ad accumulare riserve di glicogeno, lipidi, ferro e calcio che verranno trasferiti all'emolinfa (Poli & Fabbri, 2018). Le particelle di scarto vengono riversate nuovamente nello stomaco sotto forma di sferule, queste sono espulse dal sistema escretore che le convoglia ai dotti renopericardici connessi a sacchi nefridiali e, successivamente, saranno trasferite a due nefridopori che sboccano nella cavità palleale (Westheide & Rieger, 2011).

La maggior parte dei molluschi bivalvi è **gonocorica**, presentano pertanto sessi separati. Le cellule spermatiche e le uova vengono rilasciate simultaneamente nell'acqua con una fecondazione esterna. I testicoli e gli ovari sono strutture pari e semplici collocate tra i diverticoli della ghiandola digerente (Castro & Huber, 2011; Westheide & Rieger, 2011). La larva trocofera si sviluppa nel **veliger** (Figura 6), una larva planctonica che presenta una conchiglia a due valve che si accresce per apposizione marginale nella veliconca fino a raggiungere lo stadio giovanile in cui gli animali iniziano a vivere sul fondale (Castro & Huber, 2011; Westheide & Rieger, 2011).



Fig. 6. Larva veliger dei molluschi bivalvi. © Medlarvae.

Ecologia

I molluschi bivalvi sono dei tipici rappresentanti della fauna acquatica. Sono organismi caratterizzati da una grande dispersione, presenti in tutti i mari del mondo e in quasi tutti i corsi d'acqua dolce (Gosling, 2008). Sono animali bentonici e sedentari e, in alcuni casi, si possono ancorare al substrato tramite il bisso (come nel caso delle cozze) o direttamente tramite una delle due valve della conchiglia come nel caso di diverse specie di ostriche (Świacka et al., 2019). La loro distribuzione è influenzata da

caratteristiche ambientali quali: salinità, temperatura e substrato (Gosling, 2008). Vivono principalmente in acque eutrofiche, sia marine che di acqua dolce, contribuendo al ricircolo di materia e di nutrienti, prevengono e proteggono dall'erosione, inoltre, molte specie di bivalvi entrano comunemente nella catena alimentare umana (Fogliano et al., 2023).

Fra i molluschi bivalvi la famiglia dei Mytilidae è caratterizzata da un'ampia distribuzione geografica. Specie appartenenti a tale famiglia possono essere trovate in aree costiere in quasi tutti i continenti con popolazioni notoriamente sessili e ad elevata concentrazione per numero di individui (Cuevas et al., 2015; Farrington et al., 2016). *M. galloprovincialis* (Figura 7) è conosciuto comunemente con il nome di cozza mediterranea in quanto endemismo di quest'area geografica in cui si distribuisce nelle acque costali ed estuarine. È molto simile come specie al *M. edulis* la cozza spagnola la cui distribuzione, invece, si estende lungo la regione dell'Atlantico del Nord (Beyer et al., 2017).



Fig. 7. Esemplare di *Mytilus galloprovincialis*.

Le specie appartenenti al genere *Mytilus* sono ancora molto relazionate cosa che rende l'ibridazione possibile dando origine a ibridi fertili (Beyer et al., 2017). *M. galloprovincialis* è stato commercializzato ed introdotto fuori dall'area d'origine

risultando, ad oggi, una specie invasiva in differenti zone del mondo come ad esempio: Sud Africa, Sud America, Giappone, California, Nuova Zelanda e Australia (Gardner et al., 2016).

Durante la fase larvale sono animali planctonici, prima della metamorfosi, infatti, si lasciano trasportare dalle correnti per poi ancorarsi tramite il bisso (Bayer et al., 2017). La gametogenesi avviene durante la stagione invernale, ma nelle popolazioni che presentano un secondo periodo di deposizione delle uova, questo può avvenire anche in estate. Normalmente, però, questo periodo può variare leggermente nelle differenti specie del genere *Mytilus* in relazione alla localizzazione geografica della specie (Bayer et al., 2017).

L'ostrica perlifera *P. imbricata* (Figura 8), di contro all'endemico bivalve *M. galloprovincialis*, rientra nelle 100 specie più invasive del Mar Mediterraneo (Streftaris & Zenetos, 2006). Diffusasi dal Mar Rosso attraverso il canale di Suez pochi anni dopo la sua inaugurazione nel 1869, è ad oggi diffusa in tutto il bacino Orientale, con un incrementata presenza anche nel bacino Settentrionale e Occidentale (Png-Gonzalez et al., 2021). Specie Indo-Pacifica vive in ambienti temperati, subtropicali e tropicali. La si può trovare comunemente in Corea, Cina, Australia, ma anche nel Golfo Persico e in Egitto (Gervis & Sims, 1992).



Fig. 8. Esemplare di *Pinctada imbricata*.

Ad oggi il rinvenimento di questa specie è molto spiccato in Sicilia e Malta, nello Ionio e nell'Adriatico (Theodorou et al., 2019). In Grecia è stata introdotta per la mitilicoltura, ma la pesca risulta essere ancora vietata a causa della non inclusione all'interno dei Decreti Presidenziali in materia di pesca di molluschi 86/98, 227/2003 e 109/2002 (Katsanevakis et al., 2011). Recentemente ha colonizzato con successo il bacino di acqua salmastra "Laguna di Capo Peloro", riserva naturale situata nello Stretto di Messina (Donato et al., 2021) dimostrando un elevato potenziale adattativo subentrando in un'area che pochi anni prima è stata colpita dalla mortalità di massa di *Pinna nobilis*, più grande bivalve presente nel Mediterraneo (Pagano et al., 2023). È una specie tollerante alle variazioni ambientali, sessile e sospensivora delle arie subtidali, può comunemente trovarsi infossata in terreni sabbiosi (Moutopoulos et al., 2021).

***Mytilus galloprovincialis* & *Pinctada imbricata* nella ricerca come organismi modello**

I molluschi bivalvi, in particolare le specie appartenenti alla famiglia Mytilidae e Pteriidae, sono considerati importanti specie per il biomonitoraggio ambientale e per gli studi di ecotossicologia grazie alle capacità di essere filtratori e di bioaccumulare all'interno dei loro tessuti i vari xenobiotici presenti nel mezzo acquoso in cui vivono (Faggio et al., 2018; Savorelli et al., 2017). Essenzialmente tale assorbimento avviene in tre differenti metodologie:

- Accumulo tramite diffusione passiva dalla fase disciolta alle superfici esterne (principalmente branchie, mantello e parete intestinale).
- Assorbimento attivo attraverso il trasporto transmembrana mediato da pompe ioniche (a livello delle branchie e della parete intestinale).
- Assorbimento attivo per endocitosi di particelle di inquinante. (Beyer et al., 2017).

L'abilità di essere filtratori gli permette di processare grandi volumi di acqua fino ai 40-50L al giorno (Riisgård et al., 2013).

Vantaggi dell'utilizzo dei molluschi bivalvi come organismi modello risiedono nella possibilità di mantenere in laboratorio un gran numero di colture di larve o esemplari adulti che richiedono poche cure e poco impiego di materiali (Miglioli et al., 2024); nell'avere una grande distribuzione geografica con popolazioni stabili e numerose cosa che rende gli studi con l'impiego dei bivalvi facili da effettuare in diverse parti del mondo e di facile ripetibilità (Farrington et al., 2016); sono di semplice campionamento per via delle grandi concentrazioni in cui vivono le popolazioni; sono tolleranti a variazioni di temperatura; sono facilmente manipolabili in laboratorio e possono essere utilizzati sia per test *in vitro* che *in vivo* (Curpan et al., 2022).

Alterazioni del comportamento, della fisiologia o della biochimica di questi animali possono essere studiati in differenti tessuti o nei fluidi corporei (Burgos-Aceves et al., 2017). L'emolinfa è in grado di trasportare gli xenobiotici all'interno dell'organismo, qui gli emociti al seguito della presenza di sostanze estranee entrano in uno stato di **stress ossidativo**, modificando la loro forma, morendo o cambiando il volume cellulare (Ayhan et al., 2021). I bivalvi sono animali che presentano piccole variazioni tra il gradiente dei fluidi extracellulari e l'ambiente (Curpan et al., 2022). Le cellule emolinfatiche mantengono il volume costante tramite processi di regolazione cellulare che la presenza di xenobiotici possono alterare (De Mello et al., 2014). Altri indicatori di stress possono essere l'alterazione della stabilità delle membrane lisosomiali che generalmente sono impermeabili ma possono alterarsi sotto condizioni patologiche portando al rilascio di lisosomi (Aliko et al., 2015). Alterazioni dei livelli di malondialdehyde (MDA), perossidazione lipidica (LPO), enzimi antiossidanti come catalasi (CAT), glutazione perossidasi (GPx) e superossido dismutasi (SOD) possono essere calcolati (Kournoutou et al., 2020). In merito all'emolinfa di *P. imbricata* nel 2022

è stata effettuata da Pagano et al., (2023) la caratterizzazione emocitaria per la valutazione della sua possibilità di utilizzo come organismo modello.

Received: 19 September 2022 | Revised: 4 November 2022 | Accepted: 10 December 2022
DOI: 10.1002/jemt.24278

RESEARCH ARTICLE

MICROSCOPY
RESEARCH TECHNIQUE WILEY

A first insight into haemocytes of *Pinctada imbricata radiata*: A morpho-functional characterization

Maria Pagano¹ | Jacopo Fabrello² | Cristiana Roberta Multisanti¹ |
Giorgia Zicarelli¹ | Maria Ciscato² | Francesco Boldrin² | Salvatore Giacobbe¹ |
Valerio Matozzo² | Caterina Faggio¹ 

Sempre dei molluschi bivalvi possono essere utilizzati come organi modello bersaglio delle analisi le branchie e la ghiandola digestiva (DG). Quest'ultima già impiegata dagli anni '70 come organo modello, è stata utilizzata come indicatore di stress in campagne di biomonitoraggio. È stata proposta, infatti, come un tessuto bersaglio per gli studi sugli effetti metabolici dei distruttori endocrini sia in esperimenti sul campo che in laboratorio (Balbi et al., 2017).

Le cellule della ghiandola digestiva come quelle emolinfatiche possono regolare il proprio volume cellulare quando sottoposte a soluzioni ipo- o iperosmotiche. L'accumulo di xenobiotici determina l'alterazione dei soluti intracellulari che possono portare a cambiamenti volumetrici. In condizioni normali le cellule tornano allo stato iniziale, ma quando i canali ionici - che sono la fonte di regolazioni di queste variazioni - vengono danneggiati la cellula perde tale capacità (Curpan et al., 2022).

2.2 Vertebrati

2.2.1 Osteitti: Famiglia Cyprinidae

Il termine di osteitti, o più comunemente pesci ossei, fa riferimento al gruppo di vertebrati più numeroso sulla terra con, ad oggi, oltre 30.000 specie scoperte. Sono animali che nel corso dei secoli hanno colonizzato tutti gli ambienti acquatici conosciuti dagli 8000 m di profondità fino ai torrenti posti ad oltre 5200 m di altitudine, costituendo circa il 96% dei pesci e la metà del totale dei vertebrati. In questo gruppo sono oltre 3700 le specie appartenenti alla famiglia dei Ciprinidi e tra queste rientrano le specie di *C. carpio* (carpa comune) Linneus, 1758 e *D. rerio* (pesce zebra o danio zebrato) Hamilton, 1822 che, grazie alle loro caratteristiche, sono ampiamente utilizzate nella ricerca come organismi modello.

Anatomia & Fisiologia

Il tegumento dei pesci ossei è caratterizzato da strati di cellule vive il cui spessore dipende dal tipo di vita che conducono: più spesso nei pesci che vivono sui fondali (300-450 μm) e meno spesso nelle specie pelagiche (20-50 μm) (Westheide & Rieger, 2011). Sono, inoltre, numerose le cellule granulose, mucose e clavate. Nelle carpe particolari cellule clavate conosciute come **cellule giganti**, al seguito di lesioni, liberano sostanze di allarme che negli individui della medesima specie stimolano reazioni di fuga (Westheide & Rieger, 2011). In aggiunta a questi tipi di cellule, i pesci ossei presentano lungo l'epidermide, altri modelli di cellule di tipo sensoriale, fra cui molto importanti sono quelle che costituiscono il **sistema della linea laterale** in quanto permettono di recepire e registrare informazioni in merito a: forza di gravità, variazioni di pressione dell'acqua circostante, velocità di nuoto e correnti (Poli & Fabbri, 2018). All'interno dei canali della linea laterale sono presenti cellule ciliate e cellule di sostegno disposte a formare il **neuromasto**. Meccanocettori dotati di cupola,

generano impulsi nervosi costanti che vengono modificati dal movimento dell'acqua che deforma la cupola. La modificazione strutturale della cupola causa, a sua volta, il movimento degli cnidocigli che, se piegati in direzione degli stereocigli, depolarizzano la membrana e aumentano la scarica elettrica ai nervi. La posizione opposta di stereocigli e cnidocigli, al contrario, iperpolarizza la membrana rallentando la scarica. Sono il rallentamento e l'accelerazione delle scariche a permettere a questi animali di percepire la direzione da cui arriva lo stimolo (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011).

Il derma dei pesci ossei è costituito da scaglie. Esse sono formazioni ossee prive di cellule ricoperte da uno strato di pelle e di muco protettivo, strutture sottili, flessibili e sovrapposte. Sono distinte in **scaglie cicloidi** e **scaglie ctenoidi** (Figura 9). Le prime sono lisce con rilievi concentrici mentre, le ctenoidi, presentano denti e processi lungo il margine posteriore (Castro & Huber, 2011; Westheide & Rieger, 2011). In alcuni casi, i pesci ossei possono essere privi di entrambi i tipi di scaglie. I ciprinidi sono caratterizzati dalla presenza di scaglie cicloidi spesso ben visibili sul corpo dell'animale.

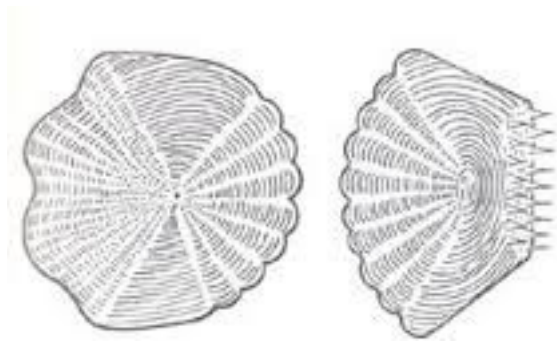


Fig. 9. Esempio grafico di scaglie cicloidi (figura a sinistra) e scaglie ctenoidi (figura a destra).

Gli osteitti, in generale, sono caratterizzati dalla presenza di uno scheletro ben definito. Partendo dal cranio esso vede l'ectopterigoide, l'endopterigoide e il dermatoplatino che presenta denti di fronte al quale si trovano il premascellare e il mascellare (Westheide & Rieger, 2011). I ciprinidi sono caratterizzati dall'assenza di denti a livello

buccale sostituiti da placche faringee che permettono la triturazione del cibo (Westheide & Rieger, 2011). Importante è la presenza a livello del cranio dell'**opercolo** o copertura branchiale. Strutture pari, gli opercoli, sono delle piastre ossee e tessuto che si trovano a protezione delle branchie (Castro & Huber, 2011). La bocca è quasi sempre terminale e le mascelle possono essere mosse in avanti.

Nei pesci ossei più evoluti il cinto pelvico è spostato in avanti arrivando fin sotto le pinne pettorali. Le vertebre presentano para-ipofisi ventrolaterali sulle quali si sono sviluppate le coste, importanti per sorreggere i fianchi (Westheide & Rieger, 2011). Lo scheletro della pinna dorsale e quello della pinna anale terminano all'interno della muscolatura ed i raggi delle pinne possono essere suddivisi in: **radii prossimali, intermedi e distali**. I lobi della pinna caudale sono generalmente della stessa dimensione per cui la coda è detta **omocerca** (Figura 10). I raggi sono modificati e rigidi e possono servire sia da timone che da protezione (Castro & Huber, 2011; Westheide & Rieger, 2011).

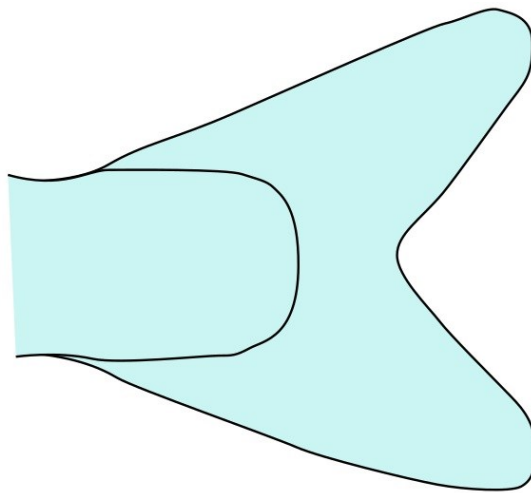


Fig. 10. Rappresentazione grafica di una pinna caudale omocerca tipica degli osteitti.

I muscoli dei pesci sono molto sviluppati per compiere rapidi movimenti e raggiungere alte velocità anche contro la viscosità dell'acqua. Sono muscoli organizzati in lamine (**miomeri**) il cui numero è di norma pari a quello delle vertebre; sono poi fra

loro separati da **miosetti**. Infine, foglietti connettivali separano il lato destro e sinistro e la metà superiore da quella inferiore (**muscoli epiassiali e ipoassiali**). I muscoli degli osteitti sono costituiti da fibrocellule la cui attività metabolica e la velocità di contrazione sono differenti in base alle loro caratteristiche. La muscolatura si divide, infatti, in: muscoli rossi, localizzati superficialmente, lungo la linea laterale, ricchi di mioglobina, e da muscoli bianchi – in maggior numero – disposti in profondità, con pochi mitocondri e privi di mioglobina (Pioli & Fabbri, 2018).

Al centro del corpo, sopra lo stomaco e l'intestino è posizionata la **vescica natatoria** una struttura sacciforme usata per il galleggiamento e per stabilizzare i movimenti durante il nuoto (Castro & Huber, 2011). Nei ciprinidi essa è una vescica natatoria **fisiostoma** con la connessione con l'intestino che persiste tramite il dotto pneumatico per tutta la vita dell'animale. Il volume della vescica natatoria di questi animali è circa il 7% del volume corporeo a causa del minor quantitativo di sali che i pesci dulciacquicoli hanno rispetto ai pesci marini. I gas derivano dall'ambiente e vengono trasferiti alla vescica natatoria tramite una rete mirabile e un epitelio secretorio quale la **ghiandola del gas**. L'ossigeno viene trasportato nel sangue prevalentemente legato alla mioglobina e in minima parte fisicamente disciolto (Westheide & Rieger, 2011; Pioli & Fabbri, 2018). Le cellule della ghiandola del gas contengono pochi mitocondri con un metabolismo prevalentemente anaerobico. Il sangue rilasciato dalla ghiandola penetra nei capillari venosi con un alto contenuto di CO₂, esso si diffonderà nel sangue arterioso abbassando il pH sanguigno che faciliterà il distacco dell'ossigeno dall'emoglobina. Nella risalita verso la superficie i fisiostomi rilasciano bolle di gas che fluiscono dalla vescica natatoria al dotto pneumatico e da qui al tubo digerente. Il grado di riempimento della vescica natatoria è regolato dal sistema nervoso autonomo che innerva ghiandola del gas e vasi sanguigni (Pioli & Fabbri, 2018). La secrezione di gas è attivata dall'innervazione colinergica che stimola la produzione di acido lattico da parte della ghiandola del gas. La dilatazione dei vasi è causata dall'inibizione

adrenergica vasomotrice che fa affluire una maggiore quantità di sangue alla ghiandola. Durante la fase di sgonfiamento, avviene un blocco del flusso di sangue diretto alla ghiandola mediante una vasocostrizione adrenergica (Poli & Fabbri, 2018). Il cuore dei pesci è formato da due cavità situate subito dietro le branchie. Il seno arterioso è estremamente ridotto e presenta una singola valvola mentre il tratto iniziale dell'aorta forma il **bulbo arterioso**. Altre strutture sono il ventricolo e il seno venoso, Figura 11 (Castro & Huber, 2011; Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011). L'atrio, formato da cellule miocardiche, è una cavità con parete sottile, al contrario, invece, il ventricolo presenta una parete miocardica molto spessa. L'organizzazione del ventricolo è di tipo misto in quanto è presente sia tessuto spugnoso che compatto particolare legato al ruolo del ventricolo che, mediante la sua contrazione, infonde il maggior quantitativo di forza propulsiva (Poli & Fabbri, 2018).

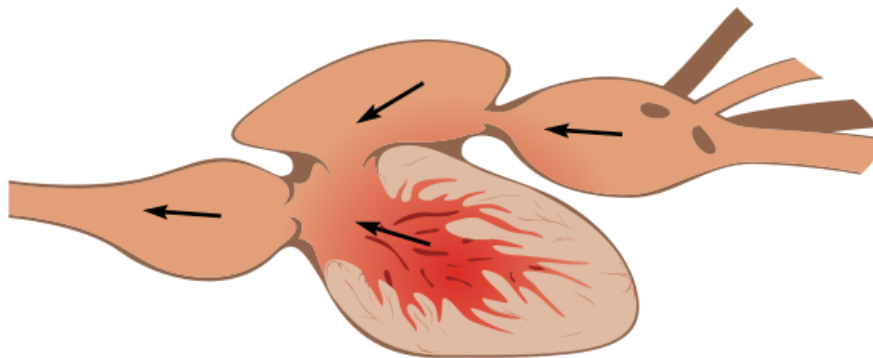


Fig. 11. Modello di struttura di un cuore di pesce osseo.

Il sangue che proviene dal corpo dell'animale, povero d'ossigeno, entra nella prima camera, viene pompato nella seconda camera e spinto alle branchie in cui lo scambio gassoso avviene. Dalle branchie, grazie all'ausilio di arterie e capillari, il sangue ossigenato verrà diffuso al resto dell'organismo (Castro & Huber, 2011). A funzionare come condotti del sangue sono i grandi vasi: l'aorta ventrale, la celiaco-mesenterica, le

arterie branchiali e le vene cardinali. La gittata cardiaca degli osteoitti è molto bassa, ma questa può essere incrementata modificando la gittata sistolica e la frequenza. Inoltre, le pinne, la pelle, la cavità buccale, le branchie e il peritoneo presentano un sistema circolatorio di tipo secondario. Esso sembra svolgere la medesima funzione del sistema linfatico in quanto l'ematocrito è molto basso. Le vene secondarie sboccano nel sistema circolatorio primario al livello del cuore o a livello della coda mediante la dilatazione contrattile del sistema ematovascolare secondario (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Riger, 2011). La grande differenza fra il sangue dei vertebrati e quello dei pesci risiede negli eritrociti che in questo gruppo sono di tipo nucleato; per quanto concerne i leucociti maggiormente rivenuti sono invece: linfociti, granulociti, monociti e piastrine (Westheide & Riger, 2011).

Gli organi respiratori sono rappresentati dalle branchie. Costituite da quattro archi branchiali, presentano una doppia fila di **filamenti branchiali o lamelle primarie** contenenti i vasi sanguigni. La struttura è protetta dall'opercolo che permette le comunicazioni con l'ambiente esterno (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Riger, 2011). Le lamelle primarie presentano sulla superficie dorsale delle lamelle secondarie le vere e proprie superfici di scambio dei gas. La camera branchiale è unica, condivisa e si apre verso l'esterno. Quando la bocca si apre gli opercoli si chiudono, la faringe si espande ed aspira all'interno della bocca acqua. Al fuoriuscire dell'acqua la bocca si chiude, la faringe si contrae e gli opercoli si aprono (Castro & Huber, 2011; Poli & Fabbri, 2018). Il flusso dei pesci, per aumentare l'efficienza di ossigenazione, è di tipo **controcorrente** (Figura 12). Il sangue fluisce con una direzione opposta a quella dell'acqua assicurando la diffusione della maggior quantità d'ossigeno. Attraversando le branchie l'acqua, che ha ceduto ossigeno, incontra il sangue impoverito proveniente dal corpo; quando il sangue passa all'interno delle branchie e si arricchisce d'ossigeno incontra l'acqua appena entrata nella camera branchiale. Questo meccanismo fa sì che l'ossigeno

nell'acqua sia sempre più ricco di quello del corpo (Castro & Huber, 2011; Poli & Fabbri, 2018).

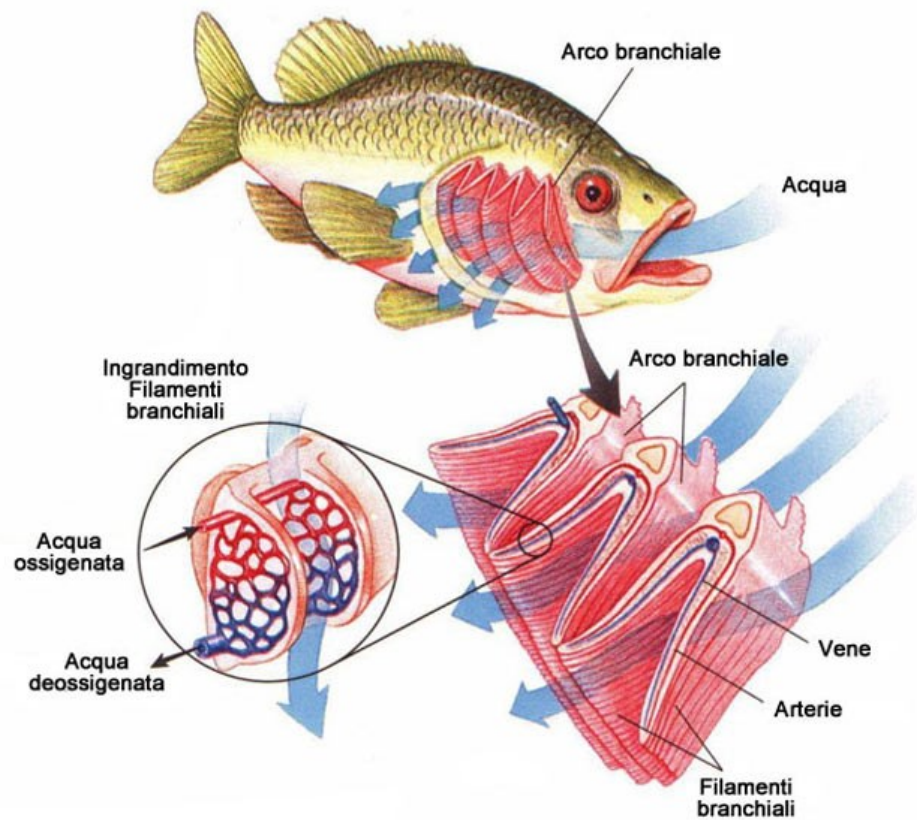


Fig. 12. Rappresentazione grafica dell'apparato respiratorio dei pesci ossei.

Il telencefalo dei pesci ossei si sviluppa per eversione. È costituito principalmente dal **sistema nervoso centrale** diviso in cervello e midollo spinale. Il cervello, protetto dalla scatola cranica, è diviso in diverse regioni e regola funzioni come olfatto e vista (Castro & Huber, 2011). Importanti al suo interno sono i neuroni giganti delle cellule di Mauthner, alloggiati nel pavimento del mesencefalo, sono impiegati nella reazione rapida di fuga; ricevono informazioni dal sistema acustico e della linea laterale, sono neuroni che presentano assoni che si estendono in direzione caudale con una conduzione pari a 50-100 m/s (Westheide & Riger, 2011).

Gli organi olfattivi sono costituiti da una coppia di camere disposte simmetricamente sulla testa comunicanti con il mezzo esterno attraverso la narice. Ogni lamella presenta

due strati di epitelio separati da uno strato di tessuto connettivo (presenta neuroni olfattivi), cellule di sostegno secernenti muco, cellule epiteliali ciliate e cellule basali (importanti per la sostituzione dei neuroni olfattivi che degenerano). La loro sensibilità varia in base ai diversi taxa (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Riger, 2011). Le cellule secernenti muco lo stratificano rendendo possibile intrappolare, tra le lamelle, le molecole di odore che devono legarsi ai siti recettoriali; le cellule cigliate, invece, tramite il loro continuo movimento mantengono costante il flusso d'acqua nell'epitelio olfattivo così da impedire l'adattamento agli odori (Poli & Fabbri, 2018).

I pesci mancano dell'orecchio esterno e, pertanto, la percezione dei suoni è a carico dell'**orecchio interno**. Organo pari, è situato subito dietro agli occhi in corrispondenza dei due lati del cervello (Castro & Huber, 2011). È costituito da tre organi otolitici a base di carbonato di calcio: il **sacculo (o sagitta)**, la **lagena (o asterisco)** e l'**urticolo (o lapillo)** che sono deputati alla ricezione dei suoni oscillando in maniera differente rispetto al resto del corpo, e da tre canali semicircolari che costituiscono l'organo dell'equilibrio. I canali semicircolari partono dall'urticolo e ospitano terminazioni sensoriali rivestite di neuromasti. Negli organi otolitici è presente la **macula**, epitelio sensoriale che presenta cellule cigliate con differenti orientazioni; esse sono immerse nell'endolinfa il liquido in cui è posto l'otolite (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Riger, 2011). Il movimento dell'otolite provoca una flessione delle stereociglia che se si muovono in direzione dello cnidociglio causano la depolarizzazione della cellula. Tale fenomeno provoca a sua volta un aumento di eccitazione delle fibre nervose afferenti che trasmettono così l'informazione sensoriale ai centri nervosi superiori. Questa stimolazione permette di percepire suoni che vanno dai 100 ai 1000 Hz (Poli & Fabbri, 2018).

A migliorare l'apparato uditivo di alcuni pesci ossei, fra cui le carpe, sono inoltre presenti l'**apparato di Weber** (una serie di ossicini) e la vescica natatoria. L'apparato di Weber è costituito da porzioni modificate del cranio, dalle prime quattro vertebre e

dalle loro appendici, dai primi sopraneurali e da diverse strutture molli (Westheide & Rieger, 2011). La stimolazione indiretta dell'orecchio permette di aumentare la banda acustica fino ai 3000 Hz ed abbassare la soglia di eccitabilità estendendo così il raggio di azione uditivo.

Gli occhi degli osteitti sono sviluppati, nella maggior parte dei casi la cornea è appiattita ed è molto sottile, inoltre presentano un cristallino sferico indeformabile (Poli & Fabbri, 2018). L'occhio dei pesci ossei è costituito da un tappeto lucido ricco di: cellule pigmentate, melanociti e cellule costituite da cristalli di guanina cosa che permette all'animale di adeguarsi alla diverse quantità di luce. Per il miglioramento della messa a fuoco, oltre al cristallino, agisce un **muscolo retrattore** la cui contrazione lo allontana dalla retina. Il rilassamento dei muscoli riporta i cristallini nella loro posizione iniziale (Poli & Fabbri, 2018).

A livello della bocca gli osteitti presentano dei bottoni gustativi costituiti da tre tipi di cellule: **cellule gustative** (intorno al poro gustativo), **cellule di sostegno** e **cellule basali**. I recettori gustativi, che legano le sostanze contenute negli alimenti, sono presenti nei microvilli apicali delle cellule gustative mentre la trasduzione coinvolge canali ionici sia sul lato apicale che su quello basale. Ad esempio, il sapore salato è dato da sali (es. il cloruro di sodio), mentre il sapore aspro è richiamato dall'eccesso di protoni, H^+ (Poli & Fabbri, 2018). Diversi ciprinidi presentano molti bottoni gustativi sulle labbra, nella regione golare, nei barbigli e nelle pinne pettorali e pelviche.

La famiglia dei Ciprinidi è caratterizzata da animali privi di denti. La demolizione del cibo avviene ad opera dei denti faringei che lavorano contro un cuscinetto cheratinizzato situato nella volta faringea a sua volta sorretto da un processo dei basisfenoidei (Westheide & Rieger, 2011). Il corto esofago è dilatabile e presenta cellule mucose per facilitare l'avanzamento del bolo alimentare. Per via dell'assenza dello stomaco esso si connette direttamente a un lungo intestino (anche 4 volte la lunghezza dell'animale) in cui avviene la digestione del cibo (Poli & Fabbri, 2018; Westheide &

Riger, 2011). L'intestino è costituito da quattro strati muscolari fra cui quello della mucosa che può essere aumentato dai ripiegamenti della mucosa e della sottomucosa. La digestione avviene soprattutto nella regione post-gastrica attraverso l'epitelio colonnare del lume dell'intestino (Poli & Fabbri, 2018). Associati all'intestino e che contribuiscono alla digestione vi sono gli organi del fegato (nella parte anteriore della cavità corporea) che produce la bile e svolge ruoli fisiologici fondamentali quali: metabolismo glucidico, lipidico e proteico, la sintesi di enzimi detossificanti e la produzione di vitellogenina proteina precursore del tuorlo dell'uovo, e il pancreas che non è ben distinto e si sviluppa in maniera diffusa. Infine, vi è la milza che produce eritrociti e leucociti (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011).

Gli osteitti di acqua dolce, come ciprinidi, sono ipersomotici rispetto all'ambiente in cui vivono pertanto l'acqua entra tramite le branchie e loro tendono a perdere sali (Westheide & Rieger, 2011). I **reni**, per tale ragione, sono costituiti da un glomerulo di grandi dimensioni, hanno il tubulo prossimale distinto in due segmenti, un segmento intermedio provvisto di ciglia, un tubulo distale impermeabile all'acqua e un dotto collettore. Il tubulo prossimale vede il riassorbimento per pinocitosi di proteine, glucosio, aminoacidi, Na^+ e Cl^- e secerne i cationi bivalenti. Le ciglia del segmento intermedio facilitano il flusso dell'ultrafiltrato. Sodio e cloro vengono assorbiti nel tubulo distale (Poli & Fabbri, 2018). Importante nelle specie dulciacquicole sono le **cellule a cloruri** e le **cellule pavimentose**. Situate prevalentemente nell'epitelio branchiale, nell'epidermide della regione orale o in corrispondenza del lato interno dell'opercolo, sono deputate le prime al riassorbimento dei sali che vengono persi insieme a feci (grazie alla presenza di un elevata quantità di mitocondri) e le seconde al passaggio dell'ossigeno (Westheide & Rieger, 2011).

I sessi sono generalmente separati e non esiste un collegamento fra i reni e le gonadi con testicoli e ovari che posseggono dotti propri. Gli spermatozoi variano da specie a specie ma in generale mancano dell'acrosoma. Gli ovari sono di regola pari con i

margini liberi che si avvolgono a formare un tubo che accoglie le uova mature. Il periodo riproduttivo è regolato internamente da **ormoni sessuali** prodotti dalle gonadi e rilasciati in piccole quantità nel sangue. Il regolamento esterno avviene ad opera di stimoli ambientali come lunghezza del giorno e temperatura (Castro & Huber, 2011; Westheide & Rieger, 2011). Il numero di uova varia in base ai differenti taxa ma, in generale, sono avvolte da un rivestimento solido chiamato corion con un'unica apertura (**micropilo**) attraverso la quale gli spermatozoi penetrano (Westheide & Rieger, 2011). Il corion nella carpa e nel danio zebra è trasparente particolarità che rende facile l'osservazione dello sviluppo embrionale.

Ecologia

La famiglia dei Cyprinidae è considerata la famiglia di pesci d'acqua dolce più numerosa al mondo (Nelson et al., 2016). A rientrare in questo gruppo sono specie utilizzate da decenni a scopi ornamentali o alimentari come, ad esempio, le carpe (*Cyprinus* spp.), il pesce rosso (*Carrasius auratus*) o il pesce zebra (*D. rerio*).

C. carpio (Figura 13) generalmente abita ambienti di acqua dolce come stagni, laghi o fiumi a bassa corrente mentre raramente può essere trovata in ambienti salmastri (Barus et al., 2001). In Europa vivono soprattutto in stagni a fondale basso, eutrofico, e che presenta un fondo fangoso e una densa vegetazione acquatica (Flajšhans & Hulata, 2007).



Fig. 13. Rappresentazione grafica di un esemplare di *Cyprinus carpio* adulto.

L'areale di distribuzione è di tipo Euroasiatico con la presenza di due sub-specie, su base genetica (*C. carpio carpio* e *C. carpio haematopterus*), che permettono il distinguo di due differenti areali: uno asiatico Orientale e uno europeo Occidentale la cui divisione è avvenuta probabilmente durante il susseguirsi di diverse glaciazioni pleistoceniche (Kirpichnikov, 1999). È una specie ormai addomesticata tanto da risultare essere la terza specie mondialmente ad essere introdotta nei diversi paesi in cui ne è stata registrata la presenza contribuendo ogni anno a circa il 70% della produzione mondiale di pesce d'acqua dolce, fino anche all'80% in alcuni paesi europei senza sbocchi sul mare con oltre 3 milioni di tonnellate prodotte (Anton- Pardo et al., 2014; Chen et al., 2022; Rahman, 2015; Xu et al., 2014). L'antenato selvatico della carpa comune probabilmente viveva nei bacini del Mar Caspio e del Mare/Lago di Aral (fra l'Uzbekistan e il Kazakistan) e da qui è avvenuta la sua dispersione (Balon, 2006).

Ad oggi le carpe europee derivano da carpe selvatiche che si erano stanziato lungo il corso d'acqua del Danubio con le prime tracce di addomesticazione che risalgono all'Impero Romano, fu poi il cristianesimo a causarne la diffusione nel continente. In Asia, invece, le prime tracce risalgono alla Cina del quinto secolo A.C. (Flajšhans & Hulata, 2007). Sono pertanto animali che hanno subito una serie di mutazioni elevate nel corso del tempo al seguito di selezione umana, adattamenti e isolamenti genetici (Mondol et al., 2006).

In Italia durante il corso del 1920 sono state documentati da Orrù et al., (2010) dei rilasci nei bacini d'acqua e in piccoli fiumi in Sardegna con la conseguente rapida diffusione della specie che, trovando condizioni climatiche favorevoli, si è facilmente adattata. Considerata importante per l'alimentazione, le leggi nazionali italiane non controllano ancora le introduzioni legali o illegali e le traslocazioni con un tasso di introduzioni non intenzionali fra i più alti in Europa (Copp et al., 2005).

La carpa comune tollera molto bene le variazioni termiche, di salinità, pH e ossigeno nell'acqua; infatti, seppur viva a temperature ottimali, che vanno dai 23 ai 30°C, sopravvive ai freddi periodi invernali anche a temperature di 3°C diventando tollerante all'ipossia (Shahjahan et al., 2020). Può sopravvivere a un ampio range di pH che va dai 6.5 ai 9 e in ambienti poveri di ossigeno (0.3-0.5 mg/L) o soprasaturi fino a 6 settimane (Flajšhans & Hulata, 2007; Shahjahan et al., 2020). La temperatura dell'acqua fra i 18 e i 20°C è quella ottimale per far avvenire la riproduzione. Durante la fase riproduttiva la femmina può deporre fino a 200.000 uova per kg di peso che, aderendo alla vegetazione, schiudono in circa una settimana (Flajšhans & Hulata, 2007). Sono comunemente chiamati "ingegneri ecologici" per via della loro abilità nel modificare l'ambiente in cui si trovano a vivere (Rahman et al., 2016).

Animali onnivori e bentivori, consumano organismi bentonici come insetti d'acqua, larve d'insetto, vermi, molluschi o zooplancton il cui consumo è soprattutto legato agli esemplari che vivono negli stagni. Possono anche consumare foglie, semi di piante (sia acquatiche che terrestri) oppure modificare la loro dieta in relazione ad altri pesci che vivono nel loro areale, in particolare in presenza di pesci appartenenti a categorie trofiche superiori (Flajšhans & Hulata, 2007; Rahman & Meyer, 2009).

Il pesce zebra o danio zebrato (Figura 14), similmente alla carpa comune, abita i corpi idrici a basso movimento o del tutto fermi come, ad esempio, i bordi dei torrenti o gli stagni, ma anche fossati e corsi d'acqua. In particolare, sono stati trovati pesci zebra in corrispondenza delle risaie, ma sono anche stati descritti in torrenti e fiumi di collina (Engeszer et al., 2007; Jayaram, 1999). Sembrano preferire acque limpide, calde, con qualche vegetazione e un fondale di timo limaccioso anche se sono stati trovati esemplari di danio zebrato in ambienti ben diversi da quelli ottimali (Arunachalam et al., 2013; Parichy, 2015). L'associazione con le risaie può essere data dalla proliferazione dello zooplancton, a causa dell'utilizzo di fertilizzanti, e dal vantaggio costituito dalle risaie in quanto luoghi dove non incontrano grandi predatori che

rappresentano il principale problema a cui deve far fronte il danio zebrato a causa delle sue piccole dimensioni (Spence et al., 2007).



Fig. 14. Rappresentazione grafica di un esemplare di pesce zebra adulto.

Sono animali con un areale di distribuzione circoscritto all'Asia Meridionale comprendente stati quali l'India, il Nepal, il Bhutan, Pakistan, Bangladesh e il Myanmar, per quanto le osservazioni in molti di questi stati non sono ancora complete (Khan & Alhewairini, 2018). Infatti, ricostruire l'esatto range di dispersione di tale specie risulta essere complicato a causa dell'elevata antropizzazione delle aree geografiche d'interesse (Meyers, 2018). Studi hanno però collocato l'areale di distribuzione del danio zebrato lungo il fiume Gange e il Brahmaputra (Spence, 2011). I pesci zebra presentano un'elevata tolleranza termica: possono infatti vivere a temperature che vanno da un range di 24.6 °C fino ad anche 38.6 °C, ma non hanno mostrato stress cardiaci neanche quando sottoposti a temperature più alte (Engeszer et al., 2007).

Come la carpa comune, anche il pesce zebra è onnivoro. Presenta, infatti, una dieta principalmente costituita da zooplancton, nematodi e insetti (Spence et al., 2007). Allo stesso tempo, però, possono anche nutrirsi di fitoplancton, alghe filamentose, piante vascolari, spore e uova di invertebrati (Spence et al., 2007). Altri rinvenimenti osservati all'interno dei contenuti stomacali sono stati anche fango e sabbia. La presenza del

fitoplancton indica come il danio zebrato si nutra nella colonna d'acqua, ma la presenza all'interno dei contenuti stomacali di insetti terrestri e di aracnidi evidenzia anche una dieta di superficie (Spence, 2011).

Come le carpe, sono animali facilmente mantenibili in acquario a temperature di circa 28° C (Meyers, 2018).

Il periodo riproduttivo dei pesci zebra è associato con la stagione monsonica da aprile ad agosto, ma si è visto che possono riprodursi anche fuori da questo range (Suriyampola et al., 2016). Si riproducono soprattutto in acque basse e con abbondante vegetazione (Engeszer et al., 2007). Una coppia di pesci zebra può fornire fino a 500 embrioni a settimana fino a migliaia di uova in una singola stagione riproduttiva (Ka & Jin, 2021).

***Cyprinus carpio* & *Danio rerio* nella ricerca come organismi modello**

I ciprinidi, *C. carpio* e *D. rerio*, grazie alle loro caratteristiche fra cui l'ecologia, lo sviluppo embrionale e le loro similarità a livello genetico con l'essere umano, date da una separazione avvenuta all'incirca fra gli 11 e i 21 milioni di anni fa, sono utilizzati ormai da diversi decenni come organismi modello per lo studio delle malattie dell'uomo (David et al., 2003; Meijer & Spaink, 2011).

I vantaggi dati dall'utilizzo della carpa come organismo modello sono da ricercare nella dieta, nell'ampia distribuzione geografica che permette il facile campionamento e la replicabilità dell'analisi, nell'importanza per l'ambiente acquatico in cui vive, l'importanza economica – in quanto comunemente allevata a scopo alimentare – ma anche per caratteristiche proprie dell'animale (Kolder et al., 2016; Mikula et al., 2024). Infatti, le grandi dimensioni del corpo dell'adulto permettono l'utilizzo di un solo individuo da cui ricavare tessuto sufficiente da organi e sangue per eseguire test di genomica, proteomica e studi metabolici senza che la contaminazione di un tessuto ricada sul tessuto vicino. Soprattutto, rispetto al pesce zebra, offre la possibilità di

ottenere tessuti ben separati anche in organi relativamente piccoli (Kolder et al., 2016). Inoltre, all'interno del genoma della carpa comune sono stati codificati geni immunitari non presenti nel danio zebrato cosa che lo rende un ottimo organismo modello anche per studi genetici, immunologici e fisiologici (Pietsch & Hirsch, 2015; Zhang et al., 2011).

Utilizzato come organismo modello per la prima volta negli anni '80 da George Streisinger e il suo gruppo di lavoro presso l'Università dell'Oregon in quanto più semplice da utilizzare rispetto al topo (Khan & Alhewairini, 2018), il pesce zebra è stato inizialmente utilizzato per lo studio dello sviluppo degli organi e, solo in seguito, per quello delle malattie umane e delle ricerche farmaceutiche (Caballero & Candiracci, 2018). Rispetto alla carpa comune, i vantaggi dello sfruttare il pesce zebra come organismo modello sono da ricercare nei bassi costi di mantenimento, nella facile messa a dimora che richiede poco spazio e, soprattutto, all'elevata similarità con il genoma umano con cui condivide il 70% dei geni e l'84% dei geni associati a malattie umane (Menke et al., 2011; Santoriello & Zon, 2012; Schlegel, 2016). Tali similarità possono essere osservate nel cervello, del tratto digestivo o della muscolatura (Schlegel, 2016).

Grazie al rapido sviluppo embrionale e al gran numero di uova dal corion trasparente sia la carpa che il danio zebrato possono essere impiegati in test embriotossicologici *in vivo* restituendo validi risultati in tempi più brevi rispetto all'utilizzo di mammiferi come organismi modello (Caballero & Candiracci, 2018; Ka & Jin, 2021). Lo stato di blastula dura 3 ore e la gastrulazione è completata già dopo 5 ore. Dopo 18 ore dalla fecondazione gli occhi, il cervello, l'orecchio interno e i segmenti muscolari sono ben formati e dopo 72 dalla fertilizzazione avviene la schiusa dell'individuo (Khan and Alhewairini, 2018). L'utilizzo di questi animali come organismi modello è, inoltre, facilitato dalla loro esclusione dalla Direttiva EU 240/2010 per i primi 5 giorni di vita corrispondenti all'incirca a 120 ore dopo la fecondazione (Marinou & Dontas, 2023).

Alterazioni del comportamento, fisiologiche, insorgenze di stress ossidativo, parametri genetici e biochimici causate dall'esposizione prolungata e non del pesce zebra a diverse tipologie di PCPs sono state studiate negli ultimi venticinque anni andando a sottolineare come il danio zebrato rappresenti un ottimo mezzo per studi di tipo ecotossicologici. Esempi dei test condotti e dei risultati ottenuti sono stati racchiusi all'interno della review di Zicarelli et al., (2022).

Environmental Toxicology and Pharmacology 94 (2022) 103923



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Toxicology and Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/etap



Evaluation of toxicity of Personal Care Products (PCPs) in freshwaters: Zebrafish as a model

Giorgia Zicarelli^a, Cristiana Roberta Multisanti^a, Francesca Falco^b, Caterina Faggio^{a,*}

^a Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres, 31, 98166S Agata-Messina, Italy

^b Institute of Marine Biological Resources and Biotechnologies, National Research Council (CNR), Mazara del Vallo, Italy

2.2.2 Anuri: *Xenopus laevis*

Gli anuri sono un ordine di anfibi al quale appartengono all'incirca 7600 specie costituendo il gruppo più numeroso della classe degli anfibi. Rientrano negli anuri specie di rane e rospi a distribuzione mondiale. Fra queste, una delle specie più importanti a fini scientifici è lo xenopo liscio *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) utilizzato sin dagli anni '50 come uno dei principali organismi modello fra i vertebrati.

Anatomia & Fisiologia

La cute per gli anfibi è molto importante in quanto è permeabile all'acqua, ai gas e agli ioni tanto da venire coinvolta sia nel processo di osmoregolazione che in quello di respirazione. Nello specifico la pelle degli anuri presenta fasci muscolari in alcune

parti del tronco e si lega alle fasce corporee più profonde tramite dei setti (Westheide & Rieger, 2011). Contiene importanti ghiandole fra cui quelle **sierose (granulose o del veleno) e mucose**, le prime secernono sostanze fungicide e battericide e sono atte alla difesa contro possibili predatori, mentre le seconde sono predisposte per l'umidificazione della superficie corporea. A queste possono, poi, associarsi ghiandole tipiche del tegumento che secernono lipidi (Westheide & Rieger, 2011). Componente importante sia della vita acquatica che di quella terrestre, gli anfibi sono animali che rappresentano una connessione tra specie più o meno evolute portando tratti anatomici e fisiologici unici ampiamente differenti tra la fase larvale, legata prettamente agli ambienti acquatici, e la fase adulta (Hopkins, 2007).

A livello scheletrico l'adulto degli anuri presenta di media un cranio appiattito con la mascella costituita da tre ossa e la mandibola sempre priva di denti. La volta cranica è irrobustita da ossa del derma che si fondono a ossa di rivestimento sottostanti a formare una volta cranica quasi completamente chiusa (Westheide & Rieger, 2011). Negli anfibi dietro l'occhio compare una membrana timpanica esterna la cui parte interna, invece, è unita a una struttura ossea denominata **columella**. L'orecchio medio vede la presenza della tromba di Eustachio che comunica con la cavità buccale. L'orecchio interno, invece, è costituito da cellule cigliate, **la papilla degli anfibi** che permette la ricezione di suoni dai 100 agli 800 Hz, e **la papilla basilare** che permette di percepire i suoni fino ai 4500 Hz (Poli & Fabbri, 2018). Alcuni anuri possono percepire i suoni anche con i polmoni che convogliano i suoni al timpano tramite connessione aerea (Poli & Fabbri, 2018). Importante è la modificazione dello scheletro postcraniale adattato al salto con una colonna vertebrale formata da 5-9 vertebre presacrali e una sacrale e con zampe posteriori allungate con tibia e fibula che vanno a fondersi fra loro prima della metamorfosi. Il cinto pelvico è costituito da ileo, ischio e pube. Il primo prende contatto con una vertebra sacrale. A livello anteriore, invece, si verifica la fusione tra radio e ulna e vi è la presenza di un pre pollice (Westheide & Rieger, 2011).

Telencefalo e diencefalo sono ben sviluppati, il mesencefalo presenta una struttura complessa con strati cellulari definiti. È presente anche il sistema della linea laterale, non solo in fase larvale, con i neuromasti che si concentrano nella zona del capo in specie come *Xenopus* spp. Tali strutture vengono utilizzate soprattutto per la localizzazione delle prede (Westheide & Rieger, 2011).

L'apparato circolatorio e le sue funzioni si vanno a modificare in relazione a se l'animale si trova nello stato larvale o in quello adulto. Nelle larve è paragonabile a quello descritto per i pesci, mentre con la comparsa dei polmoni nell'adulto varia. Il cuore (Figura 15) è costituito da tre cavità: due atri separati e da un ventricolo (Poli & Fabbri, 2018).

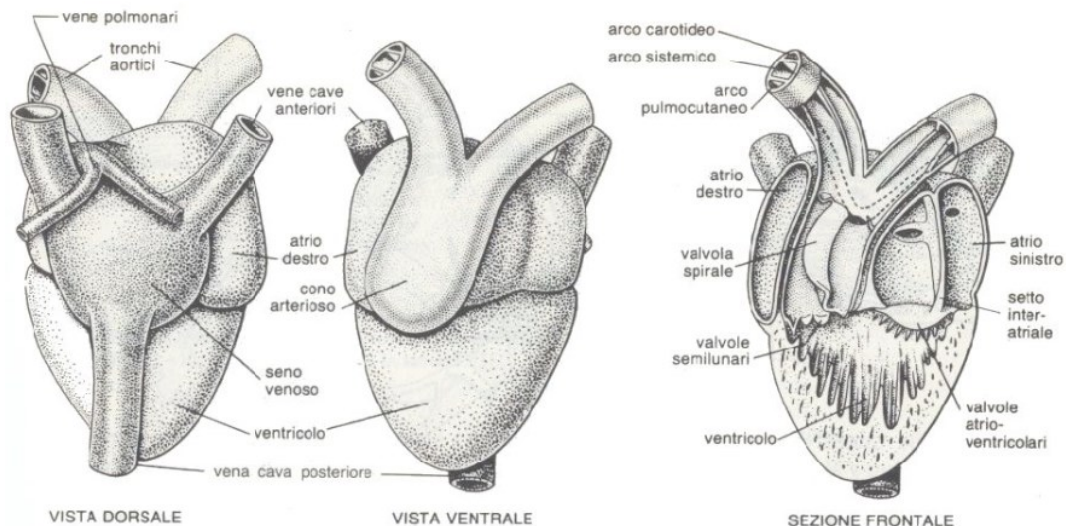


Fig. 15. Anatomia di un cuore di un anfibio adulto.

L'atrio destro accoglie il sangue venoso impoverito di ossigeno proveniente dai vari tessuti, mentre in quello sinistro è presente il sangue arterioso ricco d'ossigeno proveniente dai polmoni. Nel ventricolo vi è un mescolamento minimo fra sangue venoso e arterioso grazie a una contrazione differenziata dei due atri; prima si contrae l'atrio destro, poi il sinistro, poi il ventricolo e infine il tronco arterioso in cui è presente

la **valvola spirale** che controlla la distribuzione sanguigna tra le arterie sistemiche e l'arteria pulmocutanea (Poli & Fabbri, 2018).

Come per l'apparato circolatorio anche la respirazione degli anfib è diversa tra la fase larvale e adulta. Le larve, infatti, dispongono sia di una respirazione branchiale che di una respirazione polmonare con polmoni pari e funzionali che facilitano anche nel galleggiamento. Secondaria è invece la respirazione cutanea (Westheide & Rieger, 2011). Le branchie si sviluppano come appendici del tegumento della regione faringea che, durante la metamorfosi, vengono riassorbite a formare i polmoni le cui pareti interne si ripiegano a formare concamerazioni complesse e vascolarizzate (Figura 16) (Poli & Fabbri, 2018).

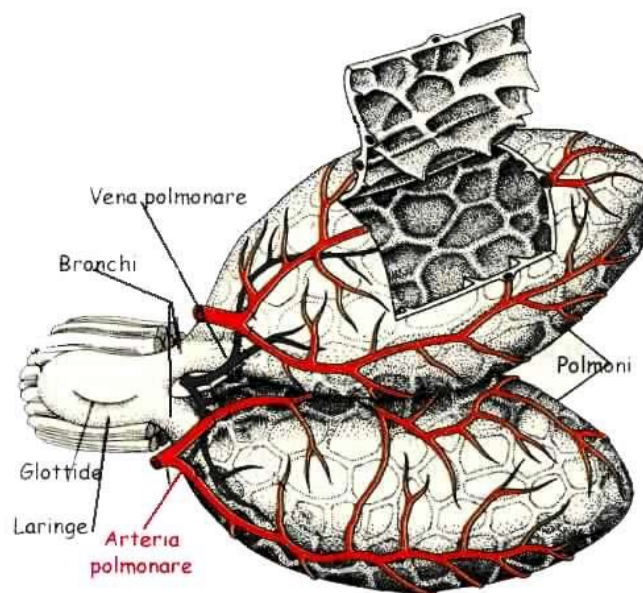


Fig. 16. Rappresentazione grafica dei polmoni di un anuro adulto.

La respirazione polmonare, però, non è la sola messa in atto dagli adulti. Infatti, in base alla temperatura a cui vivono questi animali, possono affidarsi anche alla respirazione cutanea assorbendo l'ossigeno disciolto nell'acqua. Alle alte temperature la respirazione è affidata principalmente a quella di tipo polmonare, mentre d'inverno a basse temperature gli anuri possono far avvenire gli scambi attraverso la cute che permette l'attività metabolica durante i periodi di ibernazione (Poli & Fabbri, 2018;

Westheide & Rieger, 2011). Descrivendo il ciclo respiratorio polmonare di una rana esso vede il riempimento d'aria della cavità orale; la chiusura della glottide e l'inalazione dell'aria. Essa viene convogliata in una cavità ventrale per poi passare nei polmoni quando il pavimento si solleva a narici chiuse; prima che questa fase avvenga vi è l'apertura della glottide che fa fuoriuscire l'aria che era stata precedentemente inspirata attraverso le narici (Poli & Fabbri, 2018).

Per l'alimentazione le modalità messe in atto fra le larve e gli adulti sono differenti come diversi sono l'apparato circolatorio e quello respiratorio. Le larve, infatti, si comportano principalmente come dei filtratori in cui il sistema nutrizionale è legato all'apparato respiratorio; si generano correnti nel pavimento della bocca grazie alla presenza di una pompa oscillante che richiama acqua e particelle verso le branchie in cui è presente del muco che le intrappola, sono animali privi di stomaco con un canale intestinale lungo che si avvolge nella cavità addominale; il fegato può arrivare a costituire il 25% del corpo (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011). Negli adulti, al contrario, l'apparato boccale risulta essere privo di veri denti questo perché catturano le prede tramite estroflessione della lingua, ricca di ghiandole mucose, per poi intrappolarle trattenendole con i dentelli del palato (Poli & Fabbri, 2018). Sono animali caratterizzati da un breve esofago, dilatabile grazie a delle pieghe longitudinali e ricco di ciglia, che ha il compito di produrre cellule mucose e enzimi proteolitici. Esso si collega a uno stomaco curvo, dilatabile che può accogliere prede pari alla grandezza dell'animale. L'intestino forma diverse anse presenti nella cavità addominale grazie al duodeno tratto in cui sboccano sia il fegato che il pancreas (Westheide & Rieger, 2011). Il fegato di questi animali è di tipo bilobato, presenta la cistifellea e ha la funzione di produrre i globuli rossi e le cellule del sistema immunitario. L'apparato digerente termina con il colon, il retto e un tratto terminale che prende il nome di **cloaca** (Poli & Fabbri, 2018). L'assunzione dell'acqua avviene attraverso la pelle in particolar modo nella regione ventrale posteriore del lato inferiore delle cosce che è particolarmente

vascolarizzato, la vescica urinaria funziona da deposito di acqua (Westheide & Rieger, 2011).

Negli adulti il principale organo che si occupa dell'omeostasi è il rene. In particolar modo negli anuri ruolo importante è dato dalla **vescica**, che è utilizzata come magazzino di acqua e dalla **pelle pelvica ventrale**. I nefroni sono ridotti e costituiti da capsule di Bowman, i tubuli collettori confluiscono nel dotto collettore e più dotti si riversano nell'uretere che arriva alla vescica (Poli & Fabbri, 2018). Gli anfibi grazie alle loro caratteristiche precedentemente descritte sono in grado di sopravvivere a perdite di acqua anche del 30-40% (Westheide & Rieger, 2011). In queste specie, l'ultrafiltrato si forma nel glomerulo del Malpighi luogo in cui avviene anche il riassorbimento attivo del sodio, glucosio e degli amminoacidi. Il riassorbimento del cloruro di sodio (NaCl) viene assorbito nel tubulo distale dove vi è un controllo dell'assorbimento dell'acqua a opera dell'arginina-vasotocina secreta quando l'osmolarità dei liquidi aumenta (Poli & Fabbri, 2018).

Animali a sessi separati, i testicoli si uniscono ventralmente alla porzione anteriore del rene mentre gli ovai liberano le uova mature nella cavità del corpo. L'epitelio cigliato le trasporta all'ostio dell'ovidotto. Nel maschio possiamo osservare cheratinizzazioni del tegumento – **calli nuziali** – che lo facilitano nell'abbraccio alla femmina (amplesso), Figura 17, durante la fase riproduttiva. Le uova, il cui numero può raggiungere anche 30.000, vengono deposte in acque stagnanti, correnti, sulla terra ferma, su rami, foglie o in cavità di tronchi di albero (Westheide & Rieger, 2011).



Fig. 17. Fase di accoppiamento tra esemplari di *Xenopus laevis*, i maschi abbracciano la femmina nella parte inguinale. © Berksmike da caudata.org.

Ecologia

L'appartenenza di molti anfibii all'ambiente sia acquatico che terrestre li pone in una condizione bivalente di pericoli e dinamiche da dover affrontare durante il loro ciclo vitale che possono negativamente impattare le popolazioni (Hopkins, 2007), ma allo stesso tempo questa doppia appartenenza li rende tra i vertebrati più abbondanti in molte comunità raggiungendo rispettivamente densità che vanno tra i 2500 e i 40.000 individui per ettaro (Petranka & Murray, 2001).

In questo contesto, *X. laevis* o xenopo liscio (Figura 18) è una specie che si ritrova comunemente all'interno delle acque stagnanti o in acque a lenti movimenti trovandosi occasionalmente anche sulla terra ferma. Originario del Sud Africa, è una specie che si trova a far fronte al prosciugamento degli habitat durante la stagione arida mediante l'applicazione di due opzioni: migrare in altri ambienti acquatici oppure scavare nel fango ed entrare in uno stato di stasi quali l'**estivazione** in cui

possono permanere anche per 12 mesi (Childers & Storey, 2019; Eggert & Fouquet, 2006).



Fig. 18. Esemplare di *Xenopus laevis* adulto.

L'originale areale di distribuzione va a coprire l'area meridionale dell'Africa ritrovando la specie in stati come: Sud Africa, Lesotho, Namibia, in aree del Botswana e Zimbabwe e in zone del Mozambico e dell'area nord del Malawi (Measey, 2016). A questa distribuzione si va ad associare, però, quella legata alle invasioni date dall'ampio utilizzo dello xenopo come organismo modello da laboratorio sin dagli anni '30. Popolazioni invasive e stabili, infatti, sono state confermate già dal 1996 da Tinsley & McCoid in California, Cile e in Europa, in particolar modo in Gran Bretagna, ma anche in Francia, Italia (Sicilia) e Portogallo (De Busschere et al., 2016; Lillo et al., 2013). L'elevato grado di invasività da parte dello xenopo liscio causa nelle aree di insediamento una elevata competizione per le risorse, predazione diretta degli anfibii nativi e un conseguenziale impatto negativo sul loro ciclo riproduttivo e vitale. Inoltre, l'elevata invasività ha portato nelle aree in questione all'introduzione del fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* di cui lo xenopo è risultato essere vettore (Fisher & Garner, 2007; Rödder et al., 2017).

Specie generalista, lo xenopo liscio tollera fluttuazioni di temperatura, variazioni di salinità, fame, anossia e anche di siccità dell'ambiente in cui vive (Measey et al., 2012). Animali privi di lingua, si nutrono principalmente di invertebrati come zooplankton o coleotteri acquatici, ma la presenza di zampe artigliate e di mascelle dentate permettono di afferrare prede anche di grandi dimensioni tanto che all'interno dei contenuti stomacali sono stati ritrovati resti di vertebrati e, non poco frequentemente, di altre prede terrestri che catturano grazie alla capacità di abbandonare l'ambiente acquatico in cui si trovano a vivere (Lillo et al., 2011; Measey, 1998).

***Xenopus laevis* nella ricerca come organismo modello**

La prima volta che lo xenopo venne utilizzato come organismo modello fu agli inizi del XX secolo per i saggi sulla gravidanza, ma già dal 1950 era diventato uno dei principali organismi fra i modelli vertebrati (Tadjuidje & Heasman, 2010). I vantaggi di utilizzare questo animale per studi sullo sviluppo della colonna vertebrale, ecotossicologici, come modello di stress locale o variabilità biologica, ma anche per studi genetici, risiedono nella grande facilità di riproduzione e nella grandezza delle sue uova (Borodinsky, 2017). La fecondazione delle uova può avvenire sia *in vitro* che *in vivo* cosa che può produrre un numero elevato di embrioni in pochi giorni e durante tutte le stagioni (ASTM, 2014). Sono uova 2300 volte più grandi di quelle di topo e hanno una membrana trasparente cosa che rende facile la visione dello sviluppo dell'embrione tramite delle osservazioni anche non invasive (Borodinsky, 2017).

Altri vantaggi dell'utilizzo dello xenopo liscio, soprattutto in test embriologici, risiedono: nella facile mantenimento di grandi colonie in laboratorio; la facilità di indurre il rilascio di uova da parte della femmina in qualsiasi stagione; la loro dimensione fra 1 e 1.3 mm di diametro rende possibile il prelievo degli ovociti dalla femmina prima che vengano fecondati dal maschio tecnica che permette di poter far avvenire la fecondazione delle uova anche *in vitro*; avvenendo questa fuori dal corpo

della madre è possibile manipolarla a qualsiasi stadio tramite delle microiniezioni rendendo possibile influenzare l'espressione genica; sono animali a sviluppo rapido cosa che permette facilmente di effettuare delle osservazioni accurate in approssimativamente quattro giorni di analisi; rende facile l'osservazione dello sviluppo dell'asse corporeo; ha una conservazione ad alte temperature per i principali meccanismi molecolari e cellulari (Carotenuto et al., 2023).

Tramite il metodo FETAX si è regolamentato lo studio della mortalità, l'insorgenza di malformazioni e le modificazioni dei meccanismi molecolari in risposta ai differenti stimoli e contaminanti ambientali, fra cui i PCPs e gli ECs dando prova che lo xenopo è così un ottimo modello anche per gli studi *in vivo* di tossicità ambientale e di sviluppo embrionale (Fort, 2018).

Inoltre, dal punto di vista etico, come per le larve di carpa e pesci zebra, lo sviluppo embrionale di tale specie è al di fuori della Direttiva Europea 240/2010. Infatti, fino allo stadio 46/47 che corrisponde all'incirca a 96-120 ore dopo la fecondazione delle uova sono animali che non si alimentano attivamente sfruttando il tuorlo rimasto e pertanto non c'è bisogno di approvazioni etiche in merito alla salute per condurre esperimenti *in vivo* se non superano tale stadio (Carotenuto, 2023).

Infine, lo xenopo è risultato essere molto vicino evolutivamente ai vertebrati superiori per quanto riguarda la fisiologia, lo sviluppo degli organi (occhi, fegato, polmoni, cuore, reni) e l'espressione genica cosa che – al pari del pesce zebra – rende possibile il diretto confronto e trasferimento di quelli che sono i risultati ottenuti dagli esperimenti condotti su questa specie all'essere umano (Blum & Ott, 2019; Carotenuto et al., 2021; Nenni et al., 2019).

3. Capitolo 3 – Materiali & Metodi

Partendo da numerose e differenti ricerche bibliografiche, la selezione delle sostanze a cui esporre gli organismi modello è stata effettuata seguendo diversi criteri fra cui: l'elevata frequenza di rinvenimento all'interno delle formulazioni dei PCPs, l'incrementato numero di scarichi di tali sostanze in ambiente, la complicata rimozione da parte degli impianti di depurazione, le scarse informazioni reperibili in merito agli effetti sulle comunità acquatiche e l'eventuale recente formulazione e introduzione all'interno dei PCPs a sostituzione di altri xenobiotici già considerati come dannosi e pertanto vietati nel loro utilizzo.

3.1 Sostanze testate

3.1.1 Alcol Polivinilico

L'alcol polivinilico (PVA), CAS N° 9002-89-5, è un composto sintetico con una struttura molecolare caratterizzata da una sequenza di atomi di carbonio con gruppi esteri vinilacetati sostituiti da gruppi ossidrilici la cui struttura chimica è $(\text{OH}-\text{CH}-\text{CH}_2)_n$ dove "n" rappresenta il numero dei gruppi ossidrilici presenti (Teodorescu et al., 2018). A differenza di altri alcol polivinilici, il PVA non è ottenuto dalla polimerizzazione dei monomeri degli alcol vinilici in quanto instabili ma, è derivato da una reazione di saponificazione in cui, come sopra menzionato, i gruppi esteri vinilacetati vengono rimpiazzati dai gruppi ossidrilici (Baker et al., 2012; Kanatt & Makwanna, 2020).

Sotto condizioni normali di temperatura e pressione il PVA si presenta con la forma di un cristallo bianco polveroso la cui solubilità in acqua e la resistenza ai solventi organici risulta influenzata da diversi fattori tra cui i principali sono: la taglia delle molecole, il numero di gruppi -OH che rimangono liberi all'interno della molecola, il quantitativo di legami che i gruppi -OH hanno con i gruppi acetati e quelli aldeidici e l'ampiezza con cui si creano legami eterici nella molecola (Julinová et al., 2018). In

generale, però, la solubilità di tale sostanza è risultata essere inversamente proporzionale al suo peso molecolare.

Prodotti contenenti PVA, costituiscono il più alto volume di polimeri prodotti durante il secolo corrente con oltre 650.000 tonnellate di materiali sversati in ambiente acquatico ogni anno mondialmente. Fenomeno, questo, incrementato dalla capacità di tali composti di raggiungere gli ecosistemi superando i normali sistemi di depurazione (Xu et al., 2018). Nel Mar Mediterraneo, infatti, è stato dimostrato da Suaria et al., (2016) come le particelle di PVA rappresentassero l'1,2% delle particelle di dimensioni superiori ai 700 μm in sospensione dando prova di come questa sostanza sia persistente nelle acque.

Scoperto per la prima volta da F. Klatt nel 1915, il PVA venne iniziato ad usare frequentemente dalla seconda metà degli anni '20 fino a trovarlo oggi all'interno della formulazione di lenti a contatto, lacrime artificiali e, soprattutto, nella formulazione di cosmetici come ad esempio maschere viso, creme e prodotti per capelli (Gaaz et al., 2015; Hou et al., 2015). L'elevato utilizzo del PVA, all'interno dei prodotti di uso quotidiano, è legato alle proprietà di tale composto considerato a bassa tossicità per l'uomo come dimostrato dalla review di Alves et al., (2011).

Nonostante ciò, il PVA a causa delle sue caratteristiche e dell'elevata presenza rinvenuta a livello ambientale, può rappresentare un fattore di rischio per le comunità acquatiche ancora poco studiate o del tutto sconosciute. In letteratura, infatti, sono ancora pochi i lavori che analizzano e valutano eventuali danni causati da una esposizione a differenti percentuali di PVA per le comunità non-bersaglio. Spesso, inoltre, tali lavori hanno restituito risultati in contraddizione tra di loro rendendo ancor più necessaria un'analisi mirata, tramite l'utilizzo di più organismi modello, sulle potenziali conseguenze di un accumulo di PVA (Alonso-López et al., 2021; Li, 2012; Nigro et al., 2022).

Il PVA impiegato per lo svolgimento dei seguenti esperimenti è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich (Praga, Repubblica Ceca), in due differenti taglie denominate rispettivamente PVA Low con peso molecolare di 9000 -10.000 e una percentuale di idrolizzazione pari all'80% e il PVA Medium con un peso molecolare fra gli 89.000 e i 98.000 e una percentuale di idrolizzazione del 99%.

3.1.2 Benzisotiazolinone

Il benzisotiazolinone (BIT), CAS N° 2634-33-5, è un composto eterociclico contenente zolfo a base di isothiazolinone che, grazie a un legame N-S reagisce con la trasparenza cellulare esercitando un'azione antimicrobica (Novick et al., 2013). La struttura chimica è $C_6H_4SN(H)CO$. Il BIT si presenta come un solido di colore bianco dal peso molecolare di 151.18, e viene venduto in preparazioni miscibili sia in olio che in acqua poiché è caratterizzato da una bassa pressione di vapore (5.8×10^{-5} Pa a 20 °C) e di un punto di fusione moderato (160 °C). Composto stabile dal punto di vista idrologico, il BIT può raggiungere la superficie dell'acqua attraverso il dilavamento dal suolo e qui permanere per oltre trenta giorni e, se esposto ai raggi ultravioletti, può conservare le proprietà biocide per oltre tre mesi e non essere eliminato dagli impianti di depurazione (Lugg, 2001).

Secondo la Commissione Europea, il BIT è classificato come un sensibilizzante per la pelle (Lee et al., 2023). Utilizzato sin dal secolo scorso è ancora presente all'interno dei cosmetici e creme solari a livello mondiale, per quanto in Europa e in Svizzera ha iniziato a destare preoccupazione a causa di reazioni allergiche cellula – mediate che ne hanno limitato l'utilizzo (Basketter et al., 1999; Garcia-Hidalgo et al., 2018). Il BIT è un composto largamente diffuso negli Stati Uniti all'interno della formulazione delle creme solari dove può raggiungere una percentuale dello 0.04% (EPA, 2011) senza alcuna legge di restrizione (Novick et al., 2013), è usato anche in Australia e in Canada

(SCCS, 2013). In Corea, invece, il BIT è stato trovato nei detergenti liquidi con una concentrazione media di 9.9 mg/kg (Heo et al., 2019).

La presenza del BIT in articoli a base di acqua porta al suo conseguenziale rilascio in ambiente acquatico con delle concentrazioni di rilevamento che si assestano su diversi ng/L sulla superficie dell'acqua in particolar modo durante gli eventi di tempesta (Bollmann et al., 2014). Poche, però, sono le determinazioni dettagliate delle percentuali di BIT in ambiente e dei suoi possibili effetti sui singoli organismi. In Cina, ad esempio, la concentrazione di BIT presente nel fiume Dongjiang, al seguito di analisi ambientali, è risultata andare da un minimo di 0.08 a un massimo di 34.7 ng/L (Liu et al., 2018).

L'ingente presenza del BIT in un sempre maggior numero di aree acquatiche e gli osservati rischi per la salute umana, negli ultimi anni hanno destato una conseguenziale preoccupazione legata a ciò che la prolungata permanenza in ambiente può causare alle comunità. Partendo da analisi sui batteri e sulle formazioni algali, sempre più studi si stanno focalizzando su questo importante argomento ma, ancora ben pochi sono quelli che si incentrano sulle prolungate esposizioni di differenti categorie di organismi acquatici. Ad oggi, infatti, si è scoperto che la presenza di BIT può officiare la crescita batterica e algale (Collier et al., 1990) ma che anche concentrazioni di 2.18 e 1.03 mg/L (molto più alte di quelle rilevate a livello ambientale) possono causare la morte della specie *Oncorhynchus mykiss* e di embrioni di pesce zebra dopo 96 ore di esposizione (ECA, 2022; Li et al., 2016).

Il BIT usato a fini sperimentali è stato acquistato presso la Sigma-Aldrich (Milano, Italia) con una purezza maggiore del 96.5%.

3.1.3 Glicole polietilenico

Il glicole polietilenico (PEG), CAS N° 25322-68-3, è un polimero sintetizzato dall'ossido di etilene con acqua, glicole monoetilenico o dietilenglicole, in condizioni

di alcalinità. Formato da unità ripetute di gruppi ossietilentici $-(O-CH_2-CH_2)-$, che gli conferiscono differenti pesi molecolari (Grumezescu, 2017), la sua struttura chimica completa è $HO-(O-CH_2-CH_2)_n-H$ dove “n” va ad indicare proprio il numero di gruppi ossietilenici presenti all’interno della catena. Il peso molecolare può variare dai 200 ai 20.000 g/mol e determina lo stato fisico della sostanza (Fruijtier-Pölloth, 2005). Infatti, i PEG il cui peso molecolare è fino a un massimo di 400 g/mol risultano essere liquidi, viscosi e trasparenti (a temperatura ambiente); mentre, i PEGs a peso molecolare più elevato sono composti solidi, cerosi e bianchi (Fruijtier-Pölloth, 2005). Utilizzato fin dall’inizio del secolo sia nella sua forma anionica che in quella non-ionica, per via delle proprietà non immunogene e non tossiche per l’essere umano (Bertuglia et al., 2006), e per la capacità di aumentare la solubilità delle sostanze in cui viene inserito tramite un processo denominato PEGilazione (Maes et al., 2012), il PEG, vede annualmente una produzione di milioni di tonnellate di prodotti a livello mondiale che possono raggiungere la superficie dell’acqua tramite gli impianti di acque reflue sia dopo essere stati trattati che anche senza essere stati trattati (Gajdos et al., 2007; Jang et al., 2015).

All’interno dei PCPs i PEG, e loro derivati, vengono utilizzati per la formulazione di quasi tutti i cosmetici (principalmente rossetti, mascara e blush), detergenti, balsami per la pelle, paste dentifrice, deodoranti, prodotti per i capelli, creme per la rasatura e creme mani, con delle percentuali di presenza che, secondo direttiva da parte dell’Agenzia per gli Alimenti e i Medicinali americana, devono diminuire con l’aumentare del peso molecolare dei PEG stessi. Ad esempio, è ammesso un massimo di 960.48 mg per dose di PEG 400 mentre il quantitativo scende a 100 mg per dose se ad essere usato è il PEG 8000 (FDA, 2019). Questo porta ad un accumulo in ambiente di cui, però, mancano informazioni accurate in merito alla biodisponibilità, alla tossicità in concomitanza con la presenza di altri inquinanti ambientali (Gago-Ferrero

et al., 2015; Shi, 2013) e ai tempi reali di degradazione e permanenza sulla superficie delle acque.

L'elevata presenza di PEG all'interno dei PCPs ad uso quotidiano non è assecondata da un elevato quantitativo di studi ecotossicologici che, come riportato da Nascimento et al. (2021), si concentrano soprattutto sugli effetti che un'esposizione ai PEG ha su tipici organismi modello vertebrati da laboratorio quali topi, ratti, conigli e porcellini d'india. Questo comporta, pertanto, una mancata conoscenza approfondita sui reali effetti che le specie in ambiente subiscono al seguito di una esposizione prolungata e non ai PEG. Oltre al lavoro di Nascimento e colleghi, in anni recenti, hanno iniziato a essere condotti esperimenti sulle comunità acquatiche prendendo come organismi modello differenti gruppi di invertebrati e vertebrati restituendo così le prime e importanti informazioni su queste sostanze che vanno ad evidenziare l'importanza di approfondite analisi. Tale necessità è resa esplicita anche, e soprattutto, dal fatto che PEG a pesi molecolari diversi hanno restituito diversi risultati sui modelli testati mettendo in luce le grandi lacune presenti sull'argomento (Audria et al., 2019; Hatami et al., 2019; Nascimento et al., 2021; Sönomez et al., 2020).

Alla luce di tutte le caratteristiche sopra menzionate, per i seguenti esperimenti sono stati utilizzati tre PEG con un diverso peso molecolare denominati rispettivamente PEG Low (PEG – 300), PEG Medium (PEG-8000) e PEG High (PEG-20.000) acquistati dalla Sigma-Aldrich (Praga, Repubblica Ceca).

3.1.4 Laurilsolfato di Sodio

Il laurilsolfato di Sodio (SLS) anche conosciuto come sodio dodecilsolfato, CAS N° 151-21-3, è un tensioattivo anionico di derivazione sintetica o naturale (Bondi et al., 2015). È sintetizzato dalla reazione tra l'alcol laurilico, derivato da prodotti petroliferi o vegetali, con il triossido di zolfo che permettono l'ottenimento dell'idrogeno laurilico che, neutralizzato con il carbonato di sodio, permette l'ottenimento del SLS (Product

Bulletin, 2012). La struttura chimica è $\text{H}_3\text{C} - (\text{CH}_2)_{11} - \text{O} - \text{S} - (\text{=O})_2 - \text{O}^- \text{Na}^+$. Composto non volatile idrosolubile, l'SLS, presenta un peso molecolare di 288.38 g/mol, un pH di 7.2 e un coefficiente di ripartizione pari a 1.6 cosa che lo rende un composto particolarmente idrofilo (Bondi et al., 2015).

Introdotta sin dagli anni '30 del secolo scorso come detergente emulsionante, l'SLS ha visto un incremento di 17 milioni di tonnellate pari al 46% del consumo globale di tensioattivi negli ultimi anni, con una tendenza destinata a crescere del 2.6% nei prossimi cinque anni (Bland, 2021). Solo nel 2020 il mercato mondiale di SLS è valso \$590 milioni di dollari con una tendenza di incremento del 3.8% entro il 2027 grazie anche all'ampio utilizzo che si è fatto di tale sostanza durante la pandemia da COVID-19 (Chirani et al., 2021; Pulidinindi & Bhalaerao, 2021). Sin dagli anni '90 la sicurezza dell'SLS presente nei prodotti ad uso quotidiano è risultata essere poco chiara; ciò è dovuto a cattive e confusionarie informazioni riguardanti gli effetti che il composto ha sulla salute umana e sull'ambiente (American Cleaning Institute, 2015) portandolo così all'attenzione mondiale. Inoltre, va sottolineato come le indicazioni esistenti in merito all'inserimento dell'SLS nei PCPs, fornite dalle agenzie di tutela mondiali (es. Agenzia di protezione ambientale (EPA), l'Istituto Nazionale per la salute e la sicurezza sul lavoro e il Fondo per la Difesa dell'Ambiente, sono ancora contrastanti comportando così una sua mancata regolamentazione con percentuali di presenza nei prodotti che possono andare dallo 0.01% sino anche al 50% della formulazione totale (EPA, 2019; USDA, 2006). La mancata decisione in merito alle sorti del SLS è anche favorita dall'elevato tasso di biodegradabilità della sostanza che, nell'arco delle 24h, può passare dal 45% fino al 95% di prodotto degradato; percentuale, però, diminuita dalla continua immissione dell'SLS nell'ambiente che mantiene le concentrazioni a livello naturale elevate (Cserhati et al., 2002; Fatma et al., 2015). Infatti, già nel 1989 le concentrazioni rivenute lungo le coste spagnole di SLS erano comprese tra gli 0.48 e l'1.80 mg/L (Quiroga et al., 1989) e tali concentrazioni sono solo andate crescendo negli

anni giungendo nel 2014 a delle quantità tra le 1.14 e i 3.92 mg/L nei fiumi turchi e concentrazioni tra i 4 e i 24 mg/L in quelli del Regno Unito a prova del continuo utilizzo nel tempo e dell'accumulo di tale sostanza in un ambiente non in grado di degradarla completamente (Yilmaz & Içgen, 2014).

Comuni prodotti di PCPs in cui si possono trovare quantità di SLS all'interno delle formulazioni sono: paste dentifrice, cosmetici (la percentuale di presenza può raggiungere il 50%), shampoo, schiume da barba, saponi per il corpo e creme per la rasatura.

Secondo la review di Asio et al., (2023) la produzione ecotossicologica dell'SLS è stata pubblicata principalmente tra il 1970 fino al 2010, ma ben pochi studi sono stati condotti successivamente nonostante l'incrementato utilizzo all'interno dei PCPs. Da questi test è emersa, in generale, una elevata sensibilità degli organismi marini rispetto agli organismi terrestri che invece presentavano una maggiore resistenza quando esposti a differenti concentrazioni di SLS (Irizarry-Rovira et al., 2021). Tra i principali effetti che l'SLS ha sugli organismi acquatici sono stati osservati nel corso degli anni alterazioni fisiche, fisiologiche o comportamentali in pesci, fra cui anche squali (Brunelli et al., 2008; Smith, 1991), molluschi (Freitas et al., 2020, 2021, 2023; Messina et al., 2014), copepodi (Roberts et al., 1982) o microorganismi (Fedelia et al., 2018).

Ai fini del seguente studio l'SLS con un grado di purezza > del 99% è stato acquistato dalla Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

3.1.5 Quaternium-15

Il Quaternium-15, CAS N° 4080-31-3, è un sale di ammonio quaternario derivato dall'esametenetramina tratta con 1,3-dicloropropene che permette l'ottenimento di una miscela di isomeri cis e trans (Maria et al., 2019). Gli ammoni quaternari come il Quaternium-15 sono caratterizzati da una struttura chimica avente un gruppo ammonio centrale a carica positiva permanente tipicamente legato a dei sostituenti

alchili e aromatici (Arnold et al., 2023). La struttura chimica è $[N_4H_{12}C_6 - CH_2CH = CHCl] Cl$ (Becker et al., 2010). Il Quaternium-15 si presenta come una polvere color crema dall'odore pungente, difficilmente solubile in acqua e insolubile negli oli minerali con un peso molecolare di 251 g/mol (CTFA, 1982).

In uso sin dal secolo scorso, Zheng et al., (2020) ha stimato una crescita del 62% nell'inserimento di ammoni quaternari all'interno dei prodotti al seguito della pandemia da COVID-19 questo grazie alle proprietà antibatteriche, stabilizzanti, disinfettanti e conservanti (Maria et al., 2019). Questa elevata presenza è un potenziale danno per l'ambiente e le comunità a causa della capacità da parte del Quaternium-15 di rilasciare formaldeide libera anche nell'ordine di 100 ppm (Fasth et al., 2018; Shaughnessy et al., 2014) andando così ad alterare l'equilibrio ecologico. Inoltre, è stato dimostrato che può essere un composto resistente alla degradazione metabolica e, a causa delle sue proprietà chimiche, fra cui l'essere un composto lipofilo, a permanere nell'ambiente acquatico per diversi anni al seguito del suo sversamento. Tale presenza porta a un conseguenziale assorbimento in diversa misura dagli organismi che ne entrano a contatto (Faggio et al., 2016; Pagano et al., 2016).

All'interno dei PCPs il Quaternium-15 può essere trovato nella composizione di shampoo, saponi per il corpo e prodotti per la rasatura oltre che all'interno di diverse categorie di cosmetici (Nikle et al., 2019). Studi preliminari in merito ai possibili rischi che una prolungata esposizione a tale sostanza possono avere sugli animali sono stati condotti principalmente su ratti, pulcini e porcellini d'India a cui è stata somministrato il Quaternium-15 per via orale mostrando una elevata tossicità come spiegato nella review di Becker et al., (2010). In anni recenti, inoltre, cellule di vacca e di cavallo sono state esposte a diverse concentrazioni di Quaternium-15 mostrando effetti negativi sui parametri ematologici (Arrigo et al., 2023). Pochi, invece, i lavori che valutano gli effetti causati dall'esposizione al Quaternium-15 negli organismi acquatici. Iniziali valutazioni, infatti, sono stati effettuati sulla cozza Mediterranea da Faggio et al., (2016)

e Pagano et al., (2016) ma, in letteratura, non sono presenti ulteriori informazioni in merito.

Il Quaternium-15 utilizzato ai fini dei seguenti esperimenti è stato acquistato dall'Alfa Aesar GmbH & Co.KG una filiale di Johnson Matthey (Karlsruhe, Germania).

3.2 Mantenimento animali e concentrazioni selezionate

3.2.1 Mantenimento invertebrati e concentrazioni scelte

Centocinquanta esemplari di *M. galloprovincialis*, per singolo esperimento, sono stati acquistati presso un allevamento di molluschi (FARAU S.r.l, Frutti di Mare) situato presso la località di Lago Faro nella riserva naturale della laguna di Capo Peloro a Messina. Gli esemplari, che presentavano lunghezze media di 5.5 ± 0.5 cm (lunghezza media $\pm$ errore standard), sono stati messi a dimora nel laboratorio di Ecofisiologia Animale dell'Università degli studi di Messina in vasche riempite con 20L di acqua filtrata salmastra fornita dal medesimo allevamento che ha fornito gli animali. Per una settimana gli esemplari sono stati fatti acclimatare all'interno dei nuovi acquari con cambi di acqua che venivano effettuati ogni due giorni e l'aerazione lasciata continua. Gli esperimenti hanno visto l'allestimento di due vasche per singola condizione sperimentale. All'inizio degli esperimenti *in vivo* le concentrazioni dell'inquinante venivano misurate prima e dopo il cambio dell'acqua. Durante tutta la durata dell'esperimento i bivalvi sono stati mantenuti a concentrazioni standard di salinità (3.4 ± 0.2 PSU), pH (7.6 ± 0.01) e temperatura (18 ± 0.2 °C) e il fotoperiodo giornaliero è stato fissato affinché gli animali fossero forniti del naturale ciclo di alternanza luce/buio che avrebbero ricevuto qualora fossero stati in natura. Anche in questo caso, è stata mantenuta aerazione costante ed è stato effettuato il cambio periodico dell'acqua (tre volte a settimana) mediante l'utilizzo di acqua salmastra arricchita da nutrienti.

Sugli esemplari di *M. galloprovincialis* sono stati condotti test *in vitro* mediante l'utilizzo dell'emolinfa e della DG esposte a due concentrazioni di BIT (BIT1: 0.03 µg/L; BIT2: 0.3 µg/L) per due tempi di esposizione differenti (T1: 1 ora di esposizione; T2: tre ore di esposizione). I test effettuati sono stati: valutazione della vitalità cellulare, RVD e fagocitosi. Per quanto concerne, invece, la sperimentazione *in vivo* esemplari di mitilo sono stati direttamente esposti al PVA Low (E1: 0.1 mg/L; E2: 10 mg/L) per un'esposizione totale di 14 giorni, al PEG Medium (E1: 0.1 mg/L; E2: 10 mg/L) per un tempo totale di sperimentazione di 14 giorni e al Quaternium-15 (E1: 0.5 mg/L; E2: 1 mg/L) per tempi di esposizione di 7 e 14 giorni. L'SLS è stato utilizzato per test *in vivo* che lo vedevano coinvolto in mix con l'estratto di polpa di buccia di bergamotto (BRG) per testare le proprietà nutraceutiche di quest'ultima sostanza avanzando la possibilità di inserirla all'interno della formulazione dei PCPs per contrastare l'azione tossica di tensioattivi, come per l'appunto l'SLS, riducendone così l'impatto ambientale. La concentrazione scelta è stata quella di 0.01 mg/L per un tempo di esposizione degli esemplari di 14 giorni.

Per tutte le sperimentazioni *in vivo* i test impiegati sono stati: valutazione della vitalità cellulare e della capacità di regolazione del volume cellulare (RVD) - applicata a tutte le condizioni sperimentali - valutazione dello stress ossidativo (in PVA Low e PEG Medium) e la capacità fagocitaria (valutata negli esemplari di mitilo esposti al mix tra SLS e BRG).

Gli esperimenti *in vitro* sono stati condotti in triplicato, mentre quelli *in vivo* in duplicato e per ogni esperimento sono stati organizzati gruppi di controllo con concentrazione di contaminante pari a 0 mg/L.

Per quanto concerne la stabulazione di *P. imbricata*, invece, trenta esemplari sono stati raccolti a dicembre 2022 presso il canale "Due Torri"; punto di collegamento tra il lago maggiore di Ganzirri e il Mar Ionio situato anche esso nella riserva naturale della Laguna di Capo Peloro a Messina. Gli animali sono stati dunque trasportati in

laboratorio mediante l'utilizzo di borse termiche riempite di acqua di mare. Sono stati prelevati i dati morfo-metrici degli individui; essi hanno registrato una lunghezza media della conchiglia di 7 ± 0.2 cm, un'altezza della conchiglia di 6.82 ± 0.2 cm e un'ampiezza di 2.29 ± 0.05 cm. Prima dell'inizio della fase sperimentale sono stati lasciati acclimatare per cinque giorni in un acquario ad areazione continua riempito con 300L di acqua di mare, ottenuta dal medesimo bacino di campionamento degli animali, a cui sono state controllate e mantenute costanti le condizioni chimiche: salinità (3.4 ± 0.02 PSU), pH (7.6 ± 0.01) e temperatura (16.77 ± 0.09 °C). Il fotoperiodo è stato settato affinché gli animali fossero forniti di 12 ore di luce e 12 ore di buio.

L'emolinfa dell'ostrica perlifera è stata utilizzata per condurre un test *in vitro* in cui le cellule sono state esposte a due concentrazioni di Quaternium-15 (E1): 0.1 mg/L; (E2): 1 mg/L) per tre differenti tempi di esposizione (T1: 30 minuti; T2: 60 minuti e T3: 24 ore). Nel seguente caso i test condotti sono stati la valutazione della vitalità cellulare e la valutazione dell'attività di fagocitosi.

3.2.2 Mantenimento vertebrati e concentrazioni scelte

Le uova di carpa, pesce zebra e xenopo liscio sono state acquistate da tre rivenditori e produttori autorizzati [Allevamento Rybníkářství Pohořelice a.s., Università di Mendel e Università di Masaryk rispettivamente, situate nei pressi della città di Brno in Repubblica Ceca]. Una volta selezionate e posizionate nelle piastre, le uova impiegate per gli esperimenti sono state mantenute all'interno di camere di incubazione a temperatura costante che per gli esemplari di carpa e quelli di xenopo è stata fissata a 23 ± 1 °C mentre per quelli di pesce zebra è stata settata a una temperatura pari a 26 ± 1 °C. Durante tutta la durata della fase sperimentale, invece, per tutti gli organismi modello è stata fissata un'alternanza luce/notte pari a 12 ore ognuna. Le soluzioni in cui erano immersi gli animali venivano preparate e cambiate

giornalmente. Il procedimento di preparazione sarà descritto nel dettaglio nei paragrafi successivi.

Con gli esemplari di *C. carpio* sono stati condotti esperimenti che hanno previsto l'esposizione degli embrioni a SLS e al Quaternium -15 rispettivamente a 6 e 5 concentrazioni differenti per un totale di 96 ore di esposizione. Per l'SLS sono state selezionate le concentrazioni di 0.1; 0.5; 1; 5; 10 e 15 mg/L mentre per il Quaternium-15 sono state scelte le concentrazioni di 5; 10; 15; 20 e 25 mg/L. Con gli esemplari di *D. rerio* e *X. laevis*, invece, oltre agli esperimenti con l'SLS e il Quaternium-15 alle medesime concentrazioni utilizzate sugli embrioni di carpa, con l'aggiunta dell'esposizione a 1 mg/L di Quaternium-15, sono stati anche condotti esperimenti di embrio-tossicità con il PVA (Low e Medium, concentrazioni di 0.1; 0.5; 1; 5; 10; 5 e 100 mg/L) e il PEG (Low, Medium e High, concentrazioni di 0.1; 0.5; 1; 5; 10; 5 e 100 mg/L). Come per i test *in vivo* sugli invertebrati anche quelli mediante i vertebrati sono stati condotti in doppio.

3.3 Tecniche d'analisi utilizzate

3.3.1 Vitalità cellulare

Per testare la tossicità di un prodotto o di un composto chimico l'utilizzo di saggi di vitalità cellulare si sono rivelati essere un ottimo e rapido metodo per attestarlo. Solitamente per vitalità cellulare si fa riferimento al numero di cellule sane all'interno di un campione rispetto alle cellule malate o morte (Stoddart, 2011). Fra i differenti saggi presenti quelli più semplici da applicare e più rapidi, che sono stati sfruttati ai fini del seguente lavoro, vi sono: il metodo di esclusione del Trypan Blu (TB) e il saggio di ritenzione con il Rosso Neutro (NR) applicati a campioni di emolinfa e ghiandola digestiva (DG) prelevati dagli invertebrati *M. galloprovincialis* e *P. imbricata*.

Metodo di esclusione con il Trypan Blu

È un metodo colorimetrico usato per determinare il numero di cellule vive e di cellule morte all'interno di un campione. Il TB è basato sul principio che le membrane delle cellule, quando intatte, sono in grado di mantenere all'esterno il colorante osservando così al microscopio un citoplasma chiaro. Al contrario, invece, le cellule morte a un'osservazione microscopica appariranno di colore blu in quanto le membrane permettono al colorante di penetrare con conseguente colorazione del citoplasma (Avelar-Freitas et al., 2014). Cellule e colorante non dovranno stare in incubazione per troppo tempo per evitare che quest'ultimo penetri in ogni caso nelle cellule, seppur vive, falsando l'analisi (Strober, 2015).

I campioni di emolinfa sono stati prelevati mediante l'utilizzo di una siringa con un ago di 5 cm dal muscolo adduttore degli organismi modello, mentre quelli della DG sono stati campionati mediante un processo di isolamento i cui passaggi saranno illustrati più avanti (sezione 3.2.3). I campioni sono stati incubati in una soluzione 1:1 di TB al 4% per 5 minuti per poi procedere all'osservazione (Impellitteri et al., 2024a). Il colorante è stato acquistato presso la Sigma Aldrich. Le conte di vitalità, attuate su un minimo di dieci campioni, sono state eseguite mediante emocitometri manuali quali: camere di Bürker e Neubauer acquistate presso la Fisher Scientific (Hempton, New Hampshire, USA). Infine, la percentuale di vitalità cellulare è stata estrapolata mediante l'utilizzo della formula descritta da Tresnakova et al., (2023a):

$$\text{Vitalità Cellulare (\%)} = \frac{\text{Numero di Cellule Vive}}{\text{Numero Totale di Cellule}} \times 100$$

Saggio di ritenzione con il Rosso Neutro

Come il TB anche il saggio di ritenzione con il NR è un saggio di tipo colorimetrico in cui si valuta la vitalità cellulare sfruttando l'integrità e stabilità delle membrane lisosomiali (Multisanti et al., 2024). Il saggio si basa sulla capacità da parte dei lisosomi di trattenere il colorante che colora ed evidenzia le pareti (Hu et al., 2015). Quando le membrane vengono compromesse da un inquinante, invece, il colorante apparirà sparso non permettendo di individuare i lisosomi (Moore et al., 2009).

Il saggio, come precedentemente espresso, è stato attuato su emociti e cellule della DG prelevati dagli organismi modello invertebrati mediante l'utilizzo di siringhe sterili e procedimenti di isolamento ghiandolare con le stesse metodologie applicate per il saggio del TB. I campioni sono entrati a contatto con la sostanza testata sia mediante esposizione *in vitro* che *in vivo*. Una volta ottenute le cellule, poi, sono state messe in incubazione per 10 minuti in rapporto 1:1 in una soluzione di NR allo 0.8% diluita 1:1000 (Impellitteri et al., 2024a). Le conte al microscopio sono state attuate, come per il test del TB, mediante l'utilizzo di emocitometri manuali (camerette di Bürker e Neoubouer).

3.3.2 Attività di fagocitosi

Il processo di fagocitosi è uno dei principali processi messo in atto dalle cellule per la difesa immunitaria negli invertebrati. Fra queste, le cellule emolinfatice sono in grado di inglobare al loro interno particelle e patogeni potenzialmente tossici a protezione dell'organismo (Multisanti et al., 2023). Il processo consiste di due fasi ben distinte e conseguenziali:

1. la fusione tra lisosomi e fagosomi
2. il coinvolgimento di enzimi specifici che hanno l'abilità di degradare le particelle non sicure (Pagano et al., 2023).

Pertanto, riscontrare una riduzione o un'alterazione della capacità e dell'attività fagocitaria all'interno degli emociti è buon metodo per attestare un possibile danno fisiologico negli organismi esposti ai differenti composti chimici.

Al fine dei seguenti esperimenti il test di fagocitosi è stato applicato sugli emociti prelevati da individui di cozza del Mediterraneo e ostrica perliera esposti al potenziale inquinante per più tempi. Conclusasi l'esposizione, gli emociti sono stati incubati per 30 minuti con i lieviti (*Saccharomyces cerevisiae* a una concentrazione di 1×10^7 lieviti mL^{-1}) all'interno di provette Eppendorf del volume finale di 1.5 mL. I campioni sono stati lavorati e incubati in triplicato. Terminato il periodo di incubazione, un'aliquota del campione è stata prelevata e posizionata su un vetrino sottoposto a un pretrattamento con poli-L-lisina A utilizzata al fine di facilitare l'adesione cellulare. Il vetrino è stato successivamente fissato in glutaraldeide all'1% e posto in incubazione per 5 minuti in Giemsa al 5%. Il vetrino al concludersi di questa seconda incubazione è stato sciacquato con acqua distillata e sigillato con Aquovitrex (acquistata presso Carlo Erba Reagents s.r.l.).

L'attività fagocitaria, infine, è stata osservata e valutata tramite un microscopio ottico ad un ingrandimento di 100x andando a selezionare a caso cinque differenti sezioni all'interno del vetrino seguendo il metodo esposto da Caraballal et al., (1997). Gli emociti che avevano effettuato l'attività fagocitaria apparivano con al loro interno dei lieviti che, grazie all'utilizzo del Giemsa, erano di colore blu. Il dato per essere considerato statisticamente valido ha visto la conta di un minimo di 100 cellule che hanno effettuato fagocitosi all'interno di ogni sezione analizzata (Casellas et al., 1991). I risultati ottenuti sono stati espressi secondo la percentuale di fagocitosi (% di cellule contenenti lieviti ad ogni tempo e concentrazione utilizzata) andando ad applicare la formula:

$$\text{Fagocitosi (\%)} = \frac{\text{Numero di emociti che hanno incorporato lieviti}}{\text{Numero totale di emociti}} \times 100$$

3.3.3 Regolazione volume cellulare decrescente (RVD)

In normali condizioni fisiologiche le cellule mantengono costante il loro volume, questo comporta il doverlo regolare durante le perturbazioni seguendo dei passaggi tra l'osmolarità intra o extracellulare. Le cellule pertanto possono gonfiare (regolazione del volume cellulare decrescente, RVD) o raggrinzire (regolazione del volume cellulare crescente, RVI) per poi tornare al loro volume originale, dopo un periodo di tempo variabile da cellula a cellula, al seguito del passaggio della perturbazione e al ripristino delle condizioni fisiologiche d'equilibrio (Hoffman et al., 2009). La prolungata esposizione a sostanze tossiche, però, può alterare questa capacità impedendo alle cellule di recuperare il volume cellulare originale restituendo così importanti informazioni sul danno fisiologico causato dal composto chimico utilizzato.

Isolamento ghiandola digestiva e preparazione cellulare

Il test dell'RVD è stato effettuato mediante l'utilizzo delle cellule della DG di *M. galloprovincialis* esposte sia *in vitro* che *in vivo* per differenti tempistiche e differenti concentrazioni. Seguendo il metodo riportato da Torre et al., (2013) e leggermente modificato da Pagano et al., (2017), le ghiandole sono prelevate da quattro individui, selezionati in maniera casuale, per ogni concentrazione testata. Sono state, poi, tagliate in piccoli pezzi all'interno di una soluzione isoosmotica priva di calcio e magnesio (CMFS: 220 mM HEPES, 600 nM NaCl, 12.5 mM KCl). Ridotte le ghiandole in piccoli pezzi sono state spostate in una falcon contenente al suo interno 0.01% di collagenasi (CLS IV, 175 U mg⁻¹ acquistata presso la Sigma Aldrich) e posizionate in un bagnetto termostatico per un'ora a una temperatura costante di 18°C. La sospensione così ottenuta è stata, poi, filtrata due volte mediante l'utilizzo di filtri con un diametro di 200 µm e 50 µm, risospesa in soluzione fisiologica isotonica di 1100 mOsm (ISO: NaCl 550 mM; KCl 12.5 mM; MgSO₄ 8 mM; CaCl₂ 4 mM; Glucosio 10 mM; MgCl₂ 40 mM e

HEPES 20 mM) e centrifugata per 10 minuti a 4°C a 500 rpm. L'intero processo di risospensione e centrifugazione è stato ripetuto due volte prima di riporre nuovamente il tutto per un'altra ora all'interno del bagnetto termostatico.

Analisi dell'RVD

Ad isolamento cellulare avvenuto il test è stato condotto ponendo una goccia di sospensione su un vetrino trattato con poli-L-lisina A e lasciato asciugare all'aria per cinque minuti. In seguito, il campione così preparato è stato montato e osservato sotto microscopio ottico a cui è stata connessa una fotocamera digitale ad un ingrandimento di 100x. Per dare avvio all'analisi i campioni sono stati lavati nella medesima soluzione isotonica utilizzata durante l'isolamento. Al seguito dell'individuazione e scelta delle cellule sul vetrino ad esse sono state scattate tre foto in successione e le stesse sono poi state sciacquate con una soluzione ipotonica da 800 mOsm (IPO: NaCl 350 mM; KCl 12.5 mM; MgSO₄ 8 mM; CaCl₂ 4 mM; Glucosio 10 mM MgCl₂ 40 mM e HEPES 20 mM). La soluzione ipotonica ha causato il rigonfiamento delle cellule a cui sono state scattate un totale di 15 foto. Le prime 10 foto, denominate da IPO1 a IPO10, sono state scattate nel giro di 10 minuti per un totale di una foto al minuto, mentre le restanti cinque foto (IPO11 a IPO15) sono state scattate con un intervallo di 5 minuti l'una dall'altra (25 minuti) per un tempo di osservazione delle cellule all'interno del vetrino di circa 40/45 minuti di osservazione.

Ai fini statistici sono state prese in considerazione un numero minimo di quindici cellule, per ogni gruppo sperimentale, della quale è stata calcolata l'area mediante l'utilizzo del software gratuito ImageJ (Versione 1.54i, NIH, Bethesda, Maryland, USA) che ha permesso di effettuare il confronto tra l'area delle cellule derivate dal controllo e quella delle cellule trattate.

3.3.4 Stress Ossidativo

Formulato primariamente come concetto nel 1985, lo stress ossidativo è definito come un'alterazione dell'equilibrio esistente tra pro-ossidante e difesa antiossidante in favore del pro-ossidante (Sies et al., 2017). È causato dall'esposizione a intermediari reattivi dell'ossigeno, radicali liberi, (anione superossido, perossido d'idrogeno o radicale idrossilico) che causano danni all'interno delle proteine, degli acidi nucleici e delle membrane cellulari (Storz & Imlay, 1999). In condizioni fisiologiche normali queste deviazioni dallo stato di equilibrio vengono ribilanciate grazie a sofisticati meccanismi interni che si alterano nel momento in cui xenobiotici potenzialmente tossici interagiscono con le molecole (Sies et al., 2017).

Le analisi di stress ossidativo sono state effettuate sulle branchie e sulla DG di *M. galloprovincialis* mediante lo studio della periossidazione lipidica (LPO), calcolata misurando la concentrazione di sostanze che reagiscono all'acido 2-tiobarbiturico (TBARS), l'ossidazione proteica mediante i livelli di proteine ossidativamente modificate (OMP) e l'attività di superossido dismutasi (SOD). I tessuti di branchie e DG, in minimo di 6 per ogni gruppo testato, al seguito del prelievo avvenuto in ghiaccio, sono stati omogenizzati in tampone freddo 100 mM Tris/HCl (pH 7.2) e mix di proteine inibitrici (Sigma Aldrich, Milano, Italia). Prelevata un'aliquota di omogenato ai fini della LPO, la restante parte è stata centrifugata in una centrifuga refrigerata a 4°C per 5 minuti a una velocità di 5000 giri. Dal centrifugato è stato prelevato il sopranatante sfruttato per calcolo di OMP e SOD. La concentrazione di proteine presente nel sopranatante per le rette di taratura è stata calcolata mediante il metodo di Bradford attuato utilizzando un kit commerciale (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) e usando come standard l'albumina di siero bovino (BSA).

Metodo della perossidazione lipidica (LPO)

Gli LPO sono stati studiati mediante il metodo di Tkachenko & Grudniewska, (2016). La reazione tra una soluzione composta dal: campione omogenato (0.2 mL, 10% w/v), il tampone Tris/HCl (100 mM, pH 7.2), l'acido 2-tiobarbiturico (TBA 0,8%, 0.2 mL) e acido tricoloroaceutico (TCA 20%, 2 mL) ha permesso il calcolo dei TBARS. Per 10 minuti la soluzione ottenuta è stata mantenuta in un bagnetto ad acqua la cui temperatura è stata porta a 100°C. In seguito, sempre per 10 minuti, il campione è stato centrifugato a una velocità di 7000 rpm. Prelevato il sopranatante questo è stato letto allo spettrofotometro a una lunghezza d'onda di 540 nm per determinare il contenuto di malondialdeide (MDA), il principale prodotto della LPO. Il valore di TBARS è stato così espresso come il valore della concentrazione di MDA (nmol MDA) per milligrammi di proteine o per grammi di tessuto (coefficiente di estinzione della MDA: $156,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Ossidazione proteica

I livelli di ossidazione proteica (OMP) sono stati valutati misurando il contenuto di gruppi carbonilici mediante l'applicazione del metodo tradizionale della 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) descritto da Levine et al., (1994). La validità di tale metodo è data dalla presenza di gruppi carbonilici nei tessuti che sono sintomo di un danno ossidativo delle proteine. Al seguito del prelievo dell'aliquota di sopranatante pretrattato come descritto precedentemente (paragrafo 3.2.4) essa è stata incubata per un'ora con 10 mM di DNPH (acquistato presso la filiale di Milano della Sigma Aldreich), in HCl 2M. Le proteine sono state, poi, fatte precipitare in due volumi di TCA e la soluzione così ottenuta è stata centrifugata per 20 minuti a 7000 rpm. Al termine della centrifugazione il pellet è stato lavato mediante una soluzione di etanolo-acetato di etile in rapporto 1:1 per rimuovere completamente il DNPH in eccesso. Il passaggio è stato ripetuto per 3 volte per poi dissolvere il pellet in HCl 2M in cui erano

stati inseriti 6M di guanidinio. Come per l'LPO la misurazione dei gruppi carbonilici è stata effettuata allo spettrofotometro con i derivati aldeidici letti a una lunghezza d'onda di 370 nm e quelli chetonici a una lunghezza d'onda di 430 nm utilizzando il coefficiente di estinzione di $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. I risultati sono stati infine espressi come nmol per mg di proteine.

Attività della superossido dismutasi (SOD)

La SOD è stata, infine, determinata sfruttando il metodo del pirogallolo redatto da Marklund & Marklund, (1974) e leggermente modificato secondo il metodo descritto da Filice et al., (2021). L'effetto inibitorio della SOD sull'autossidazione del pirogallolo a un pH di 8.20 è stato analizzato spettrofotometricamente a una lunghezza d'onda di 420 nm a temperatura ambiente (25°C). La reazione è stata condotta in 50 mM Tris-HCl, 1 mM di EDTA, 0.2 mM di pirogallolo e monitorata ogni 30s per un totale di 5 minuti di osservazione. Una unità d'attività di SOD è stata, poi, definita come l'ammontare degli enzimi che inibiscono il 50% dell'autossidazione del pirogallolo. I risultati sono stati espressi come U mg^{-1} di proteine.

3.3.5 Embrio-tossicologia

I test di embrio-tossicologia, come descritto anche nei paragrafi soprastanti, sono stati attuati mediante l'utilizzo di embrioni derivati da tre differenti modelli vertebrati (carpa comune, pesce zebra e xenopo). Gli embrioni sono stati osservati dallo stadio di 16-cellule – per i pesci – e 6/7 segmenti – per gli anfibi – fino a un massimo di 96 ore post fecondazione delle cellule uovo (hpf). Nello studio dei Cyprinidae è stata impiegata una versione modificata del test di tossicità acuta degli embrioni di pesce (FET) che fa seguito alla linea guida 236 dell'OECD (OECD, 2013). Mentre, per lo

studio delle uova di rana la metodica usata è una variante della FET secondo il protocollo espresso da Medkova et al., (2023).

Mediante l'utilizzo di uno stereomicroscopio embrioni che avevano raggiunto uno stadio di sviluppo appropriato e risultavano essere ben formati sono stati selezionati e distribuiti in piastre costituite da 24 pozzetti (un embrione a pozzetto). Gli animali sono stati esposti a 2 mL di soluzione contenente ISO water per i pesci, prodotta seguendo il protocollo ISO 7346, 1996, e acqua "Ringer" modificata (MMR water = 0.1 M NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5) per gli anfibi prodotta seguendo le direttive del metodo espresso da Ubbels et al., (1983). La ISO water e la MMR water sono state, poi, utilizzate in unione al potenziale inquinante secondo la diluizione scelta. Le soluzioni venivano preparate e sostituite giornalmente. I gruppi di controllo sono stati trattati solo con ISO water e MMR water prive di alcuna sostanza potenzialmente tossica.

Ogni 24, 48, 72 e 96 ore (hpf) sono stati valutati i principali punti critici di embriotossicità secondo la metodologia di Nagel, (2002):

1. **Tassi di mortalità:** sono stati considerati morti tutti gli embrioni che mostravano segni di coagulazione, assenza di battito, mancanza di formazione di somiti, mancato distaccamento della coda dal resto del corpo.
2. **Tassi di schiusa:** è stata valutata un'alterazione dei tempi di schiusa degli esemplari trattati rispetto a quelli del gruppo di controllo sia essa accelerata o rallentata.
3. **Comparsa di malformazioni:** alterazione della pigmentazione (iperpigmentazione o depigmentazione), comparsa di edemi (pericardici, cranici ecc.), ematomi, deformazioni corporee (malformazioni a livello della colonna vertebrale e della coda, mancato sviluppo di organi).

Dopo 48 hpf per gli embrioni di carpa e danio zebrato e dopo 56 hpf per quelli di rana (per via di una migliore trasparenza dell'embrione), è stata effettuata l'osservazione della velocità di battito cardiaco secondo il protocollo descritto da Blahova et al., 2021

che prevede l'osservazione manuale mediante una ispezione visiva ripetuta tre volte per ogni embrione. Il numero di battiti è stato contato per 30 secondi e il risultato è stato espresso come numero di battiti al minuto. Ogni osservazione è stata condotta da personale "cieco" rispetto al trattamento effettuato. Infine, alle 96 hpf dopo l'osservazione di mortalità, schiusa e malformazioni sono state prelevate le lunghezze degli embrioni mediante una fotocamera Leica integrata all'interno dello stereomicroscopio utilizzato (Leica Application Suite, LAS X – software di immagine e analisi per microscopi a campo largo).

3.4 Analisi statistiche

I dati statistici dei test condotti sugli invertebrati, dopo il controllo della normalità e dell'omogeneità effettuato andando ad impiegare i test di Kolmogorov-Smirnov e Levene, sono stati processati tramite l'uso dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post-hoc test per il confronto. Il software scelto per l'elaborazione della significatività del dato è stato GraphPad Prism, Versione 8.2.1 (GraphPad Software Ltd, La Jolla, California, USA). Mentre, i dati statistici sui vertebrati sono stati elaborati mediante l'impiego del software per Excel Unistat versione 6.5. Sulle analisi di mortalità, schiusa e malformazioni è stato applicato un test del chi-quadro (χ^2). Invece, per quanto concernono le analisi statistiche effettuate sulla velocità del battito cardiaco e la variazione di lunghezza, i dati ottenuti sono stati verificati nell'omogeneità e nella normalità mediante l'applicazione dei test di Shapiro-Wilk e Levene e in seguito è stato applicato il test non parametrico Kruskal-Wallis ANOVA a cui è succeduta l'applicazione del Dunn's post hoc test che ha permesso di determinare la differenza tra la media dei gruppi di controllo e di quella dei gruppi sperimentali.

Tutti i dati raccolti sono stati considerati come significativi quando il valore di p è risultato essere inferiore di 0.05.

4. Capitolo 4 – Risultati

4.1 Risultati esposizione al PVA

4.1.1 Invertebrati

L'esposizione della cozza mediterranea mediante PVA è stata effettuata *in vivo* per un tempo di 14 giorni utilizzando due differenti concentrazioni di PVA Low (E1: 0.1 mg/L; E2: 0.2 mg/L) selezionate al seguito dei risultati ottenuti dai test *in vivo* sui vertebrati. I risultati di seguito illustrati sono stati oggetto dell'articolo scientifico dal titolo Personal care products a potential source of aquatic pollution: effect of polyvinyl alcohol on physiological and antioxidant responses in *Mytilus galloprovincialis* – Multisanti, C.R., Zicarelli, G., Caferro, A., Filice, M., Blahova, J., Vazzana, I., Piccione, G., Imbrogno, S., Faggio, C., Impellitteri, F. attualmente sottomesso in Journal of Hazardous Materials.

Vitalità cellulare

I dati acquisiti dalla conta degli emociti e delle cellule di DG, saggiate mediante TB e NR, sono stati schematizzati in Tabella 1. Considerando le cellule emolinfatiche, trattate sia con la prima che con la seconda concentrazione di PVA Low, esse mostravano una riduzione della vitalità cellulare – seppur minima – rispetto alle cellule estratte dagli organismi del gruppo di controllo. Tale riduzione è risultata significativa, rispetto agli emociti del controllo, solo nella colorazione di TB ($p < 0.05$) nel trattato a concentrazione maggiore (10 mg/L) di PVA Low.

Tabella 1. Saggi di vitalità cellulare degli emociti e delle cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* utilizzando i saggi colorimetrici del Trypan Blu e del Rosso Neutro.

Gruppi Sperimentali			
Saggio	Controllo	E1 (0.1 mg/L)	E2 (10 mg/L)
	Vitalità Emociti		
Trypan Blu	99.8 ± 0.1	98.7 ± 0.4	98.0 ± 0.7*

Rosso Neutro	99.3 ± 0.4	98.4 ± 0.5	98.3 ± 0.3
	Vitalità Ghiandola Digestiva		
Trypan Blu	99.5 ± 0.3	99.5 ± 0.2	98.7 ± 0.3
Rosso Neutro	99.8 ± 0.1	99.4 ± 0.1	99.0 ± 0.3*

I risultati sono stati espressi come la percentuale media delle vitalità ± l'errore standard. Le analisi sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dall'applicazione del Tukey post hoc test. I risultati osservati essere statisticamente significativi rispetto al gruppo di controllo sono stati scritti in grassetto ed evidenziati dalla presenza dell'asterisco "***" (* p < 0.05). Non è risultata alcuna differenza significativa fra i trattati.

Al contrario, le cellule di DG esposte a PVA Low (Tabella 1) dopo i 14 giorni non hanno mostrato, rispetto al controllo, percentuali di riduzione nella vitalità visibili. Le vitalità medie cellulari si sono attestate al di sopra del 99% sia nella colorazione mediante TB che mediante NR. In quest'ultimo gruppo, in E2 si ottenuta l'unica significatività rispetto al controllo (p < 0.05). Non sono state evidenziate differenze significative tra i trattati.

Test dell'RVD

Dopo i 14 giorni di esposizione le cellule della DG sono state sottoposte al test di RVD, i cui risultati ottenuti sono visibili nella Figura 19. In questo test sia la prima che la seconda concentrazione di PVA Low non hanno fatto registrare risultati statisticamente significativi. Tuttavia, dal grafico, risulta essere evidente come il trattamento delle cellule con questa sostanza abbia portato ad andamenti di rigonfiamento cellulare meno uniformi rispetto a quelli osservati nel controllo, specialmente nelle cellule esposte a E2, con una mancata capacità da parte di queste ultime di ritornare al loro volume naturale dopo la somministrazione della soluzione ipotonica. Inoltre, le cellule dei trattati hanno manifestato un andamento opposto. Quelle esposte a E1 ad IPO12 hanno cominciato a raggrinzire rispetto al volume iniziale mentre, al contrario, quelle esposte a E2 sono rimaste in uno stato di gonfiore

per tutta la fase sperimentale anche dopo IPO15. Anche il massimo rigonfiamento raggiunto è stato inferiore rispetto a quello delle cellule del controllo. Infatti, queste ultime, hanno mostrato un rigonfiamento massimo pari al 20.5%, rispetto al volume iniziale, raggiunto ad IPO6. Mentre, sia le cellule esposte a E1 che quelle esposte a E2 hanno ottenuto un rigonfiamento massimo del 19.8% durante IPO5 per poi iniziare a diminuire il loro volume.

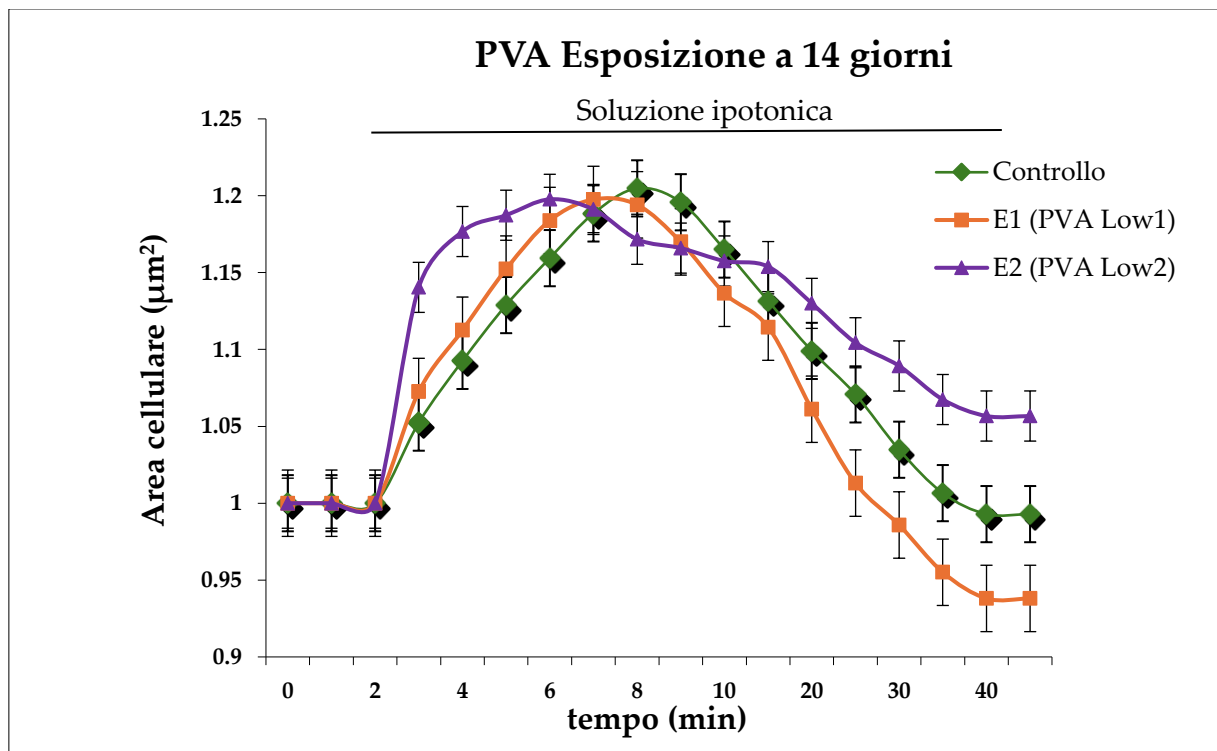


Fig. 19. Regolazione del Volume cellulare di cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* esposte a due concentrazioni di PVA Low (E1: 0.1 mg/L; E2: 10 mg/L). I dati sono stati espressi come la media dei valori $\pm$ l'errore standard di minimo 15 cellule selezionate. I dati di controllo sono stati evidenziati dalla presenza del simbolo dei rombi "◆", E1 da quello dei quadrati "■" e E2 dai triangoli "▲". I test statistici sono stati effettuati mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. Non sono state osservate ed evidenziate differenze significative tra trattati e gruppo di controllo.

Stress Ossidativo

Le analisi condotte riguardanti il subentrare del possibile stress ossidativo di *M. galloprovincialis* causato da una esposizione subcronica al PVA hanno evidenziato

alterazioni nell'attività LPO, degli OMP e della SOD in particolar modo a livello delle branchie rispetto ai campioni derivati e analizzati dal gruppo di controllo. Entrando più nello specifico, nella Figura 20 sono espressi i valori di LPO, OMP (derivati chetonici e aldeidici) e SOD nelle branchie per i tre gruppi. Per quanto i valori di LPO dei trattati non sono significativi rispetto ai valori ottenuti nel controllo, i dati registrati dell'MDA all'interno delle branchie prelevate dagli animali esposti ad E2 sono risultati più elevati rispetto a quest'ultimo. Significatività ($p < 0.05$), invece, sono state osservate sia nei valori dei derivati chetonici che di quelli aldeidici delle branchie di mitilo. Infatti, come osservabile nella Figura 20, i livelli di OMP nelle branchie degli individui, nelle concentrazioni selezionate, hanno mostrato valori più elevati rispetto al gruppo di controllo per entrambi i derivati. In questo caso i valori di E1 sono risultati essere anche più elevati rispetto a quelli della concentrazione maggiore selezionata. Nella SOD, infine, la significatività ($p < 0.05$) è stata evidenziata e registrata in risposta all'esposizione al PVA Low (E2) dopo i 14 giorni di esposizione con un'attività aumentata rispetto a quella delle cellule delle branchie del gruppo di controllo.

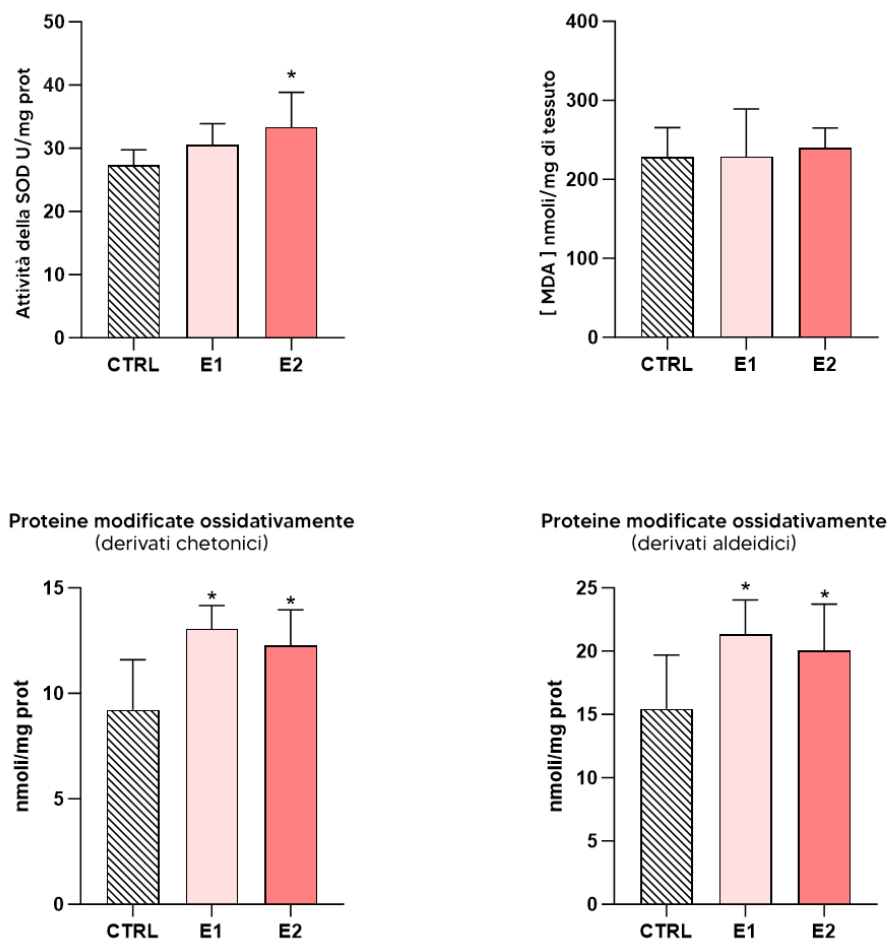
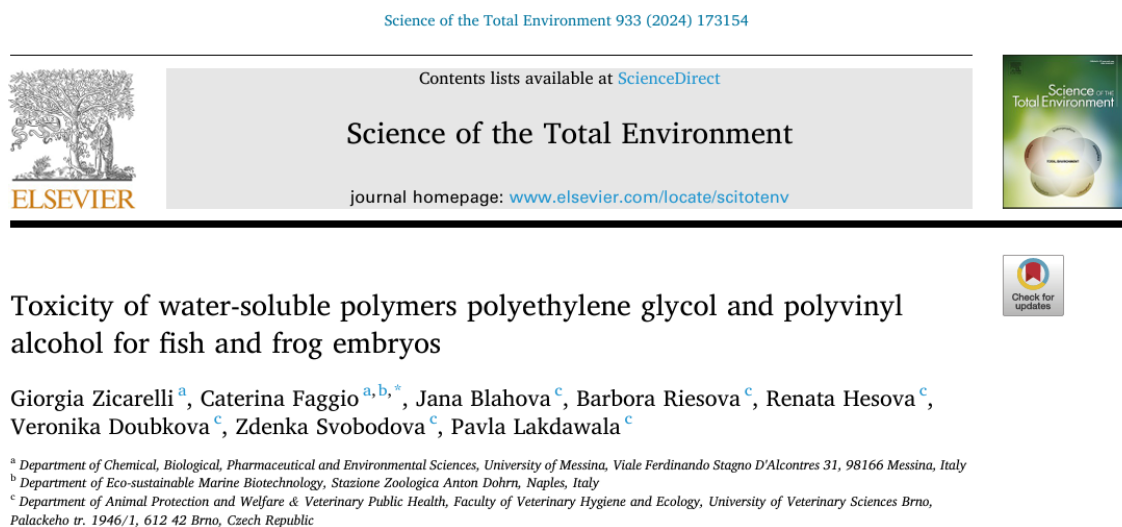


Fig. 20. Istogrammi sull'attività della SOD, dei TBARS calcolati mediante MDA e degli OMP (gruppi chetonici e aldeidici) all'interno delle branchie di *Mytilus galloprovincialis* esposte a due concentrazioni di PVA Low (E1: 0.1 mg/L; E2: 10 mg/L). I dati sono stati espressi come il valore medio assoluto $\pm$ l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. I dati significativi rispetto al gruppo di controllo sono stati messi in evidenza dalla presenza di un asterisco "*" (* $p < 0.05$). Non sono stati osservati cambiamenti significativi tra i trattati.

Al contrario di quel che si è registrato per le branchie, lo stato ossidativo delle cellule della DG è apparso non essere influenzato da nessuna delle due concentrazioni di PVA Low scelte ai fini sperimentali. Sia l'MDA, gli OMP – entrambi i derivati – che l'attività della SOD non mostravano importanti ed elevate variazioni rispetto al gruppo di controllo ($p > 0.05$) e pertanto i dati in merito non sono stati riportati graficamente.

4.1.2 Vertebrati

I test di embrio-tossicità con esposizione a due taglie di PVA (Low e Medium) sono stati condotti su embrioni di danio zebrato ed embrioni di xenopo liscio. I dettagli di tale esperimento sono consultabili in maniera più approfondita nel lavoro Zicarelli et al., 2024a di seguito riportato.



Tassi di mortalità

I risultati ottenuti sul tasso di mortalità degli embrioni di pesce zebra, come descritto in Tabella 2, non sono apparsi essere statisticamente significativi. Le poche mortalità osservate presentavano percentuali molto basse (4.2%). Al contrario, tassi di mortalità elevati e statisticamente significativi sono stati visibili negli embrioni di xenopo esposti alle concentrazioni di 50 e 10 mg/L per il PVA Medium dopo 96 ore di esposizione (Tabella 2). In questo caso la massima percentuale di mortalità ottenuta è stata quella alla concentrazione di 50 mg/L in cui il 25% degli embrioni ($p < 0.05$) è risultato morto alla fine del periodo di analisi. Come per gli embrioni di danio zebrato anche in quelli di xenopo trattati mediante PVA Low, non sono stati osservati tassi di mortalità significativa.

Tabella 2. Tasso di mortalità cumulativa espresso in % degli embrioni di *Danio rerio* e *Xenopus laevis* esposti a sette concentrazioni di PVA Low e Medium più un gruppo di controllo.

Mortalità Cumulativa (%)								
Gruppi	PVA Low							
	<i>Danio rerio</i>				<i>Xenopus laevis</i>			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1 mg/L	0	0	0	4.2	0	12.5	16.7	16.7
0.5 mg/L	0	0	0	0	0	16.7	16.7	16.7
1 mg/L	0	0	4.2	4.2	0	16.7	16.7	16.7
5 mg/L	0	0	0	0	0	4.2	8.3	12.5
10 mg/L	0	0	0	0	0	8.3	8.3	8.3
50 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/L	0	0	0	0	0	8.3	12.5	12.5
	PVA Medium							
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1 mg/L	0	4.2	4.2	4.2	0	0	0	4.2
0.5 mg/L	0	0	4.2	4.2	0	0	4.2	8.3
1 mg/L	0	0	0	0	0	0	4.2	4.2
5 mg/L	0	0	0	0	0	0	4.2	4.2
10 mg/L	0	0	4.2	4.2	0	0	0	8.3
50 mg/L	0	4.2	4.2	4.2	0	4.2	20.8*	25.0*
100 mg/L	0	0	0	0	0	4.2	16.7	20.8*

I risultati sono espressi come la somma delle mortalità per la singola concentrazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I dati significativi ottenuti rispetto al gruppo di controllo sono stati evidenziati dal grassetto e dalla presenza di asterischi “*” (* p < 0.05).

Tassi di schiusa

Alterazioni dei tassi di schiusa sono stati registrati solo negli embrioni di pesce zebra dopo 72 ore dall'esposizione. Questi animali, infatti, hanno mostrato una schiusa accelerata rispetto a quella del gruppo di controllo nelle concentrazioni di 50 e 100 mg/L (PEG Low) con rispettivamente l'83.3% (p < 0.01) e il 95.8% (p < 0.001) degli embrioni schiusi. Alle medesime condizioni gli embrioni del gruppo di controllo presentavano una schiusa inferiore al 40% degli individui (Figura 21A). Al contrario per gli embrioni di pesce zebra esposti a PVA Medium quello che si è osservato è stato

un significativo ritardo della schiusa alla concentrazione di 0.1 mg/L. Infatti, dopo 72 ore solo il 4.2% degli embrioni a questa concentrazione risultavano usciti dall'uovo rispetto a quelli del gruppo di controllo che vedeva schiusi il 37.5% degli embrioni (Figura 21B). I tassi di fuoriuscita dal secondo strato dell'uovo degli esemplari di xenopo non sono risultati essere alterati in nessuna delle due sostanze per nessuna delle concentrazioni testate e pertanto non sono stati graficamente riportati all'interno del testo.

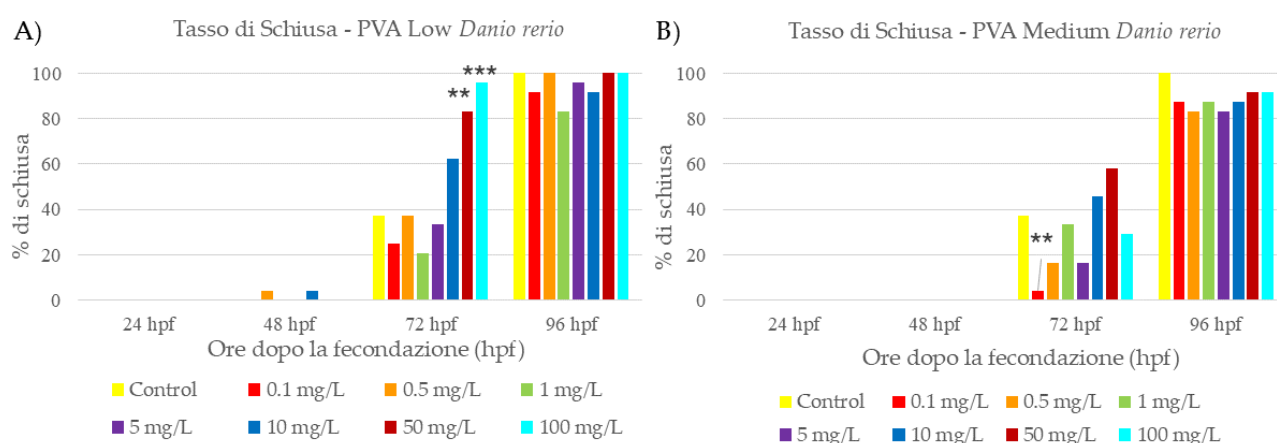


Fig. 22. Istogrammi dell'andamento di schiusa degli embrioni di *Danio rerio* esposti a differenti concentrazioni di PVA Low (Fig. 22A) e Medium (Fig. 22B) per 96 ore. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I risultati sono espressi in percentuale (%) e i dati significativi rispetto al controllo sono evidenziati dalla presenza di asterischi "*" posti in corrispondenza della colonna in cui si è registrata la significatività (** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$).

Comparsa e valutazione malformazioni

Negli embrioni di pesci zebra esposti alle differenti taglie di PVA non sono state osservate significatività nell'insorgenza di malformazioni. Come riportato in Tabella 3 e visibile in Figura 23, la massima percentuale di malformazioni è stata raggiunta negli embrioni esposti a 5 e 50 mg/L di PVA Low (20.8%) e a 5 mg/L di PVA Medium (25%).

Fra le malformazioni osservate spiccavano: la comparsa di ematomi, edema pericardici e una riduzione della pigmentazione. Al contrario, invece, per gli embrioni di xenopo sono state registrate percentuali di malformazioni statisticamente significative (Tabella 3). Gli esemplari esposti a PVA Low alle concentrazioni di 5 e 50 mg/L hanno mostrato significatività dopo 96 ore ($p < 0.05$ e $p < 0.01$) con una massima percentuale pari al 58.3% degli embrioni malformati. Allo stesso tempo, quelli esposti a PVA Medium già dopo sole 48 ore di esposizione alla sostanza presentavano malformazioni significative ($p < 0.05$) fino al raggiungimento di un picco dopo 96 ore dove in tutte le concentrazioni prese in esame la percentuale di individui malformati, rispetto al gruppo di controllo, superava il 50% ($p < 0.05$; $p < 0.01$ e $p < 0.001$). La percentuale massima è stata osservata negli embrioni esposti a una concentrazione di 50 mg/L (PVA Medium) che hanno registrato un'incidenza di malformazioni pari al 79.2% degli esemplari studiati. Oltre alle precedentemente menzionate malformazioni osservate anche per gli embrioni di pesce zebra, quelli di xenopo presentavano: deformazioni del corpo, della spina dorsale e della coda, pigmentazione ridotta e riduzione della normale lunghezza della coda, assenza o malformazioni degli occhi e malformazioni a carico del cranio. In Figura 23 sono riportati alcuni esempi.

Tabella 3. Comparsa di malformazioni espresse in percentuale (%) degli embrioni di *Danio rerio* e *Xenopus laevis* esposti a sette concentrazioni di PVA Low e Medium più un gruppo di controllo.

Comparsa di malformazioni								
Gruppi	PVA Low							
	<i>Danio rerio</i>				<i>Xenopus laevis</i>			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	8.3	8.3	8.3	0	12.5	16.7	16.7
0.1 mg/L	0	8.3	8.3	12.5	0	8.3	12.5	20.8
0.5 mg/L	0	4.2	4.2	4.2	0	16.7	16.7	29.2
1 mg/L	0	8.3	12.5	25.0	0	4.2	8.3	29.2
5 mg/L	0	20.8	20.8	20.8	0	20.8	25.0	50.0*
10 mg/L	0	16.7	16.7	16.7	0	8.3	12.5	20.8
50 mg/L	0	20.8	20.8	20.8	0	25.0	33.3	41.7
100 mg/L	0	0	0	0	0	16.7	37.5	58.3**
PVA Medium								

Controllo	0	8.3	8.3	8.3	0	12.5	16.7	16.7
0.1 mg/L	0	0	0	4.2	0	33.3	50.0*	62.5**
0.5 mg/L	0	12.5	12.5	12.5	0	29.2	50.0*	54.2*
1 mg/L	0	12.5	12.5	12.5	0	41.7	50.0*	50.0*
5 mg/L	0	20.8	20.8	25.0	0	29.2	45.8	62.5**
10 mg/L	0	8.3	8.3	12.5	0	29.2	50.0*	66.7**
50 mg/L	0	8.3	12.5	20.8	0	45.8*	70.8***	79.2***
100 mg/L	0	12.5	16.7	16.7	0	41.7*	45.8	58.3**

I risultati sono espressi come la somma delle malformazioni per singola concentrazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I dati significativi ottenuti rispetto al gruppo di controllo sono stati evidenziati dal grassetto e dalla presenza di asterischi "***" (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

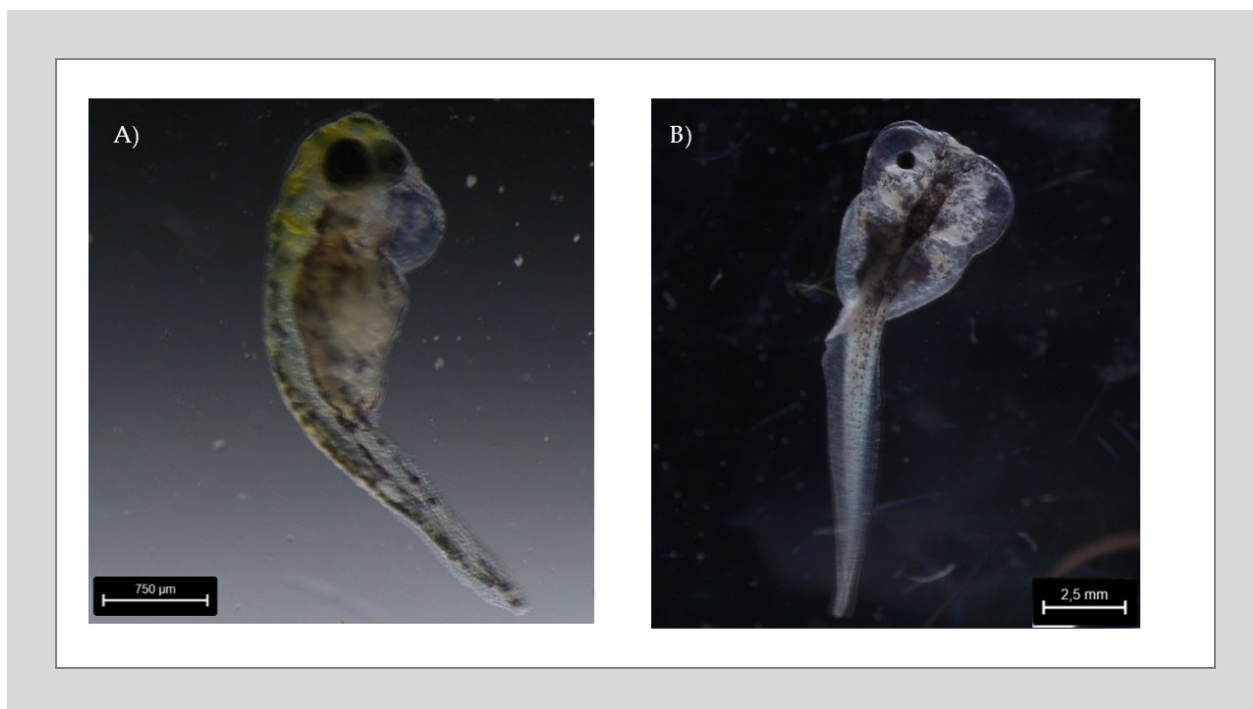


Fig. 23. Esempi di malformazioni subentrate in embrioni di *Danio rerio* (Fig. 23A) al seguito di esposizione a concentrazione di 100 mg/L di PVA Medium dopo 96 ore di esposizione e in embrioni di *Xenopus laevis* (Fig. 23B) al seguito dell'esposizione alla concentrazione di 0.1 mg/L di PVA Medium dopo 96 ore di esposizione. Sugli embrioni è visibile la presenza di edema pericardici, malformazioni del cranio con comparsa di edema, malformazioni a carico della colonna vertebrale (curvatura), alterazioni della lunghezza del corpo e mancato o tardivo sviluppo di organi (assenza/ritardo nello sviluppo dell'occhio destro nell'esemplare di xenopo).

Frequenza Cardiaca

Per quanto concerne la frequenza cardiaca, l'esposizione degli esemplari di pesce zebra al PVA Low e al PVA Medium ha fatto emergere significatività nelle concentrazioni di 5, 10, 50 e 100 mg/L di PVA Low ($p < 0.05$ e $p < 0.01$) in cui gli embrioni hanno mostrato un numero di battiti al minuto maggiore e accelerato rispetto al battito degli embrioni del gruppo di controllo; tale andamento, seppur privo di significatività, è stato osservato anche negli embrioni di danio zebrato esposti a tutte le concentrazioni di PVA Medium che, ancora una volta, presentavano un numero di battiti al minuto accelerato rispetto a quello del gruppo di controllo (Tabella 4).

Tabella 4. Frequenza cardiaca degli embrioni di *Danio rerio* e *Xenopus laevis* esposti a sette concentrazioni di PVA Low e PVA Medium.

Frequenza Cardiaca (numero battiti/min.)		
PVA - LOW	<i>Danio rerio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Controllo	151.3 ± 2.7	104.3 ± 2.7
0.1 mg/L	148.5 ± 3.2	93.3 ± 2.6*
0.5 mg/L	162.0 ± 4.3	96.3 ± 3.9
1 mg/L	162.0 ± 3.7	91.3 ± 3.7**
5 mg/L	168.0 ± 4.7*	96.0 ± 4.8*
10 mg/L	169.5 ± 4.5*	88.8 ± 2.1***
50 mg/L	169.5 ± 2.2**	94.6 ± 2.2*
100 mg/L	169.5 ± 3.1**	87.4 ± 2.0***
PVA - MEDIUM	<i>Danio rerio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Controllo	185.5 ± 4.5	104.3 ± 2.7
0.1 mg/L	185.3 ± 4.4	113.1 ± 5.5
0.5 mg/L	164.7 ± 5.4	105.6 ± 3.8

1 mg/L	176.2 ± 6.6	107.5 ± 3.7
5 mg/L	163.2 ± 5.2	105.2 ± 4.9
10 mg/L	218.2 ± 6.7	112.7 ± 4.4
50 mg/L	200.3 ± 10.1	99.8 ± 4.1
100 mg/L	196.2 ± 7.3	92.1 ± 3.5*

I dati sono espressi come la media dei valori registrati ± l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del Kurskal-Wallis seguito da Dunn's post hoc test. I dati risultati essere statisticamente significativi rispetto al gruppo di controllo sono evidenziati dall'utilizzo del grassetto e degli asterischi ""*"" (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

Per quanto concerne, la frequenza cardiaca osservata nei gruppi test degli embrioni di xenopo essa ha presentato un andamento opposto a quello precedentemente ottenuto per i pesci zebra; gli esemplari testati, infatti, sia mediante PVA Low che PVA Medium, presentavano un numero di battiti significativamente più rallentato rispetto a quello degli individui del controllo (Tabella 4). In particolar modo, negli embrioni esposti a PVA Low, fatta eccezione per la concentrazione di 0.5 mg/L, si è osservato un rallentamento significativo in tutti i gruppi sperimentali (p < 0.05; p < 0.01; p < 0.001).

Lunghezza media

In entrambi gli animali testati sia nel PVA Low che nel PVA Medium il parametro della lunghezza non ha fatto registrare alcuna alterazione significativa rispetto al gruppo di controllo alla fine della fase sperimentale. Hanno fatto eccezione gli embrioni di pesce zebra esposti alla concentrazione di 0.5 mg/L PVA Medium (p < 0.05).

Per l'assenza di risultati significativi i dati non sono stati riportati.

4.2 Risultati esposizione al BIT

4.2.1 Invertebrati

La sperimentazione sul BIT è stata condotta mediante test *in vitro* atti a valutare la tossicità acuta sull'emolinfa e le cellule di DG del mitilo. L'esposizione delle cellule interessate è stata di 1h (T1) e di 3h (T2) a due concentrazioni test. Dalla seguente analisi è stato prodotto un articolo scientifico dal titolo: "Evaluation of cellular and physiological alterations of cells from *Mytilus galloprovincialis* exposed to benzisothiazolinone (Impellitteri et al. 2025).



Vitalità cellulare

L'esposizione degli emociti e delle cellule di DG alle due concentrazioni di BIT (BIT1: 0.03 µg/L; BIT2: 0.3 µg/L) sono stati sintetizzati nella Tabella 5 ma, entrando più nello specifico, ad emergere è stata la non presenza di significatività rispetto al gruppo di controllo dopo un'ora di trattamento. Dalla tabella è però osservabile come la vitalità delle cellule emolinfatichiche esposte a BIT1 hanno mostrato una riduzione maggiore rispetto al gruppo di controllo di quella delle cellule trattate mediante BIT2. Al contrario, dopo tre ore di esposizione, se la riduzione della vitalità delle cellule esposte a BIT1 è rimasta stabile quella degli emociti trattati mediante BIT2 ha mostrato una significativa riduzione rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$).

Tabella 5. Saggi di vitalità cellulare degli emociti e delle cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* mediante l'utilizzo dei saggi colorimetrici del Trypan Blu e del Rosso Neutro a due differenti tempi di esposizione (1h e 3h).

Gruppi Sperimentali				
Saggio	Tempo	Controllo	BIT1 (0.03 µg/L)	BIT2 (0.3 µg/L)
Vitalità Emociti				
Trypan Blu	1h (T1)	98.5 ± 1.4	97.8 ± 1.5	98.5 ± 1.8
Rosso Neutro	1h (T1)	98.0 ± 1.1	97.3 ± 1.5	98.0 ± 1.1
Trypan Blu	3h (T2)	98.5 ± 1.4 ^a	97.0 ± 1.8 ^a	96.0 ± 1.7 ^b
Rosso Neutro	3h (T2)	98.0 ± 1.1 ^a	97.3 ± 2.3 ^a	94.3 ± 1.5 ^b
Vitalità Ghiandola Digestiva				
Trypan Blu	1h (T1)	99.2 ± 0.8	99.0 ± 0.0	98.7 ± 0.5
Rosso Neutro	1h (T3)	98.7 ± 0.5	98.5 ± 0.5	99.7 ± 0.5 ^b
Trypan Blu	3h (T2)	99.2 ± 0.3 ^a	97.8 ± 0.2 ^b	99.3 ± 0.2 ^a
Rosso Neutro	3h (T2)	98.7 ± 0.5 ^a	97.5 ± 1.1 ^b	99.3 ± 0.5 ^a

I risultati sono espressi come la media percentuale delle vitalità ± l'errore standard. I dati sono stati elaborati mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dall'applicazione del Tukey post hoc test. Lettere diverse corrispondono a percentuali di significatività diverse ($p < 0.05$).

Un andamento simile a quello osservato negli emociti è stato ottenuto anche nelle cellule di DG trattate mediante le due concentrazioni di BIT. Come osservabile in Tabella 5, infatti, le cellule esposte a BIT1 dopo tre ore di trattamento presentavano delle riduzioni di vitalità significative quando colorate mediante metodo del TB e del NR ($p < 0.01$ e $p < 0.05$, rispettivamente). Nelle cellule di DG trattate mediante BIT2 è stata osservata un significativo aumento della vitalità rispetto al gruppo di controllo dopo un'ora di esposizione ($p < 0.05$) con la percentuale di vitalità pari al 99.67% nella colorazione con il NR. A tutte le altre condizioni la vitalità degli emociti esposti a BIT2 non è risultata significativa.

Attività di fagocitosi

L'osservazione dell'attività fagocitica ha messo in luce una alterazione da parte delle cellule emolinfatiche trattate di effettuarla di tipo tempo e concentrazione dipendente. Specificatamente, come visibile in Figura 24(A) durante T1, rispetto al gruppo di controllo, le cellule esposte a BIT1 ed esposte BIT2 hanno subito una significativa riduzione dell'capacità di fagocitosi ($p < 0.01$, in entrambe le concentrazioni). Le percentuali sono infatti passate dal 97.3% registrato dalle cellule del controllo, al 89.3% registrato nelle cellule esposte a BIT1, al 69.0% delle cellule esposte al BIT2. Ad emergere è stata conseguenzialmente anche la netta e significativa riduzione tra l'attività fagocitica di BIT1 e quella di BIT2 ($p < 0.01$). Continuando la tendenza osservata durante la prima ora di esposizione, anche durante il T2 (Figura 24B) è stata osservabile una progressiva e aumentata riduzione dell'attività fagocitaria nelle cellule esposte a BIT1 e BIT2 risultata essere significativa rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.01$, per entrambe le concentrazioni). Infatti, come riportato nel grafico, le cellule esposte a BIT2, dopo tre ore manifestavano una riduzione della capacità fagocitica pari al 11.8% delle cellule totali contate al fronte di un'attività fagocitaria osservata durante T1 nella medesima concentrazione pari al 60.0% delle cellule totali osservate. Le cellule del controllo, invece, hanno mantenuto percentuali di attività fagocitica superiori al 95%. Come per T1, infine, il cambiamento dell'attività di fagocitosi fra gli emociti dei due gruppi sperimentali è risultato essere significativo ($p < 0.01$) dopo tre ore di esposizione con gli emociti di BIT1 in grado di fagocitare maggiormente rispetto a quelli di BIT2.

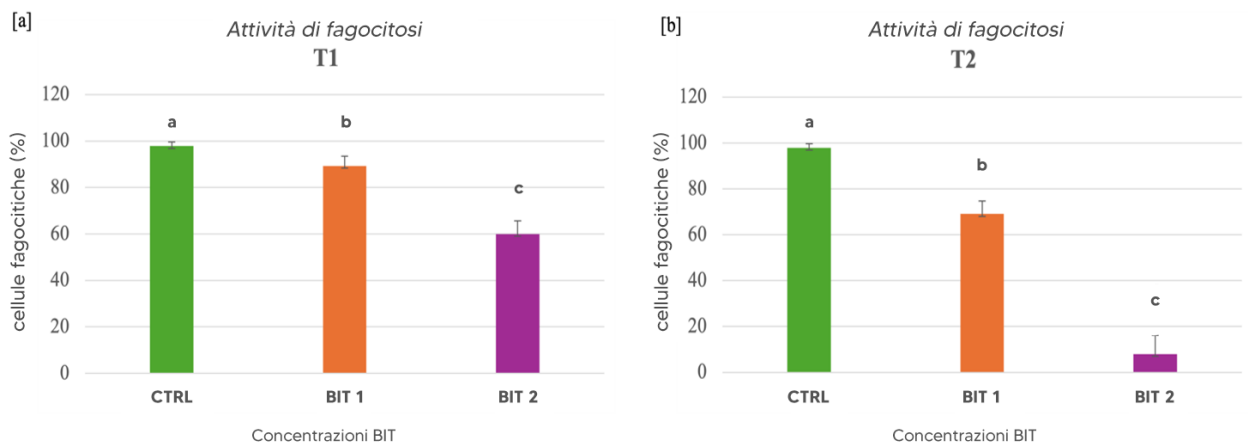


Fig. 24. Istogrammi sull'attività fagocitica degli emociti di *Mytilus galloprovincialis* esposti a due concentrazioni di BIT (BIT1: 0.03 µg/L; BIT2: 0.3 µg/L) in due tempi di osservazione (T1: 1 ora; T2: 3 ore). I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via seguito dall'applicazione del Tukey post hoc test. I dati sono stati espressi come la percentuale delle cellule che hanno effettuato la fagocitosi. Lettere diverse indicano significatività diverse ($p < 0.01$).

Test dell'RVD

La capacità delle cellule della DG di ritornare al volume originale, una volta sottoposte a soluzione ipotonica, è ben visibile nelle cellule del gruppo di controllo sia durante il T1 che durante il T2 (Figure 25 e 26). Al contrario, come mostrato nel grafico, le cellule esposte al BIT (in entrambe le concentrazioni) riportavano dopo un'ora andamenti completamente diversi a quelli visti per il controllo. L'incremento volumetrico delle cellule incubate con il BIT1 è risultato essere maggiore rispetto al gruppo di controllo (30.1% e 25.8% rispettivamente) mentre, per le cellule trattate con il BIT2 è stata osservata l'incapacità di performare alcun incremento una volta sottoposte a soluzione ipotonica (3.8%). In entrambi i tratti la capacità di ritornare alla forma e volume iniziale è stata alterata. Le cellule esposte a BIT1 sono rimaste in uno stato di rigonfiamento, per quanto non significativo, rispetto al controllo mentre, quelle esposte a BIT2 sono raggrinzite con deviazioni statisticamente significative ($p < 0.01$). Significatività è stata riscontrata anche fra l'andamento delle cellule del gruppo trattato con BIT1 e quelle del gruppo trattato con BIT2 ($p < 0.01$).

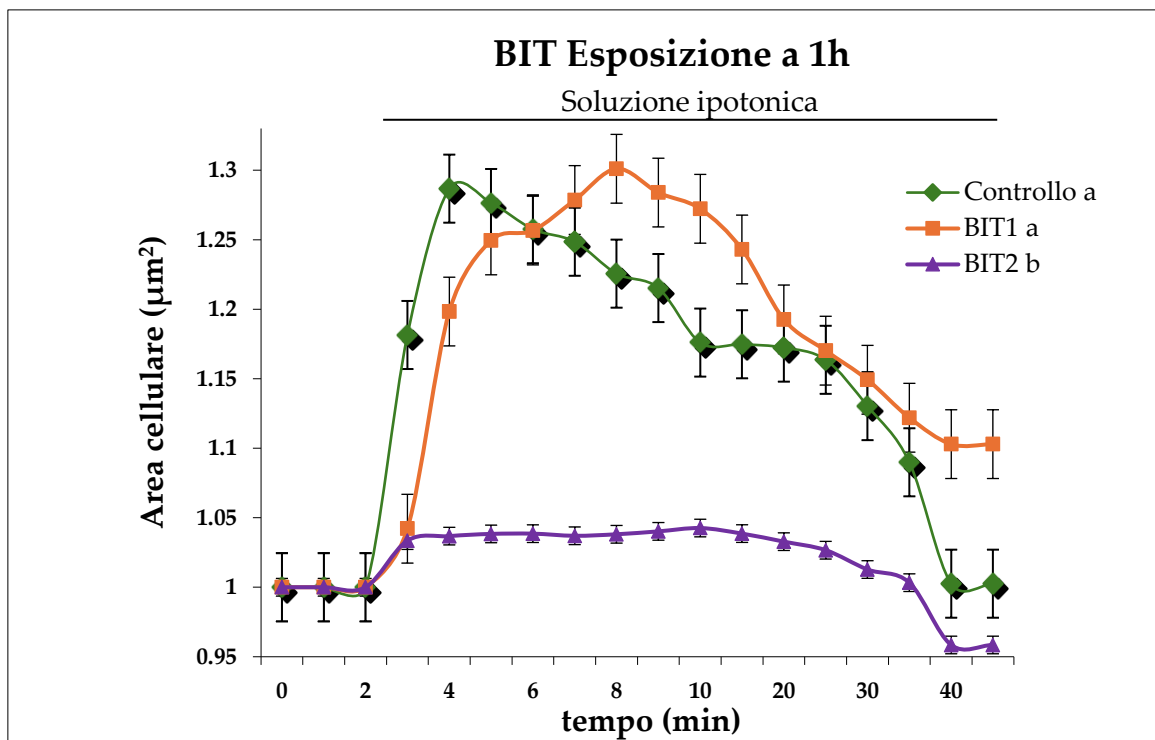


Fig. 25. Regolazione del Volume cellulare di cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* esposte a due concentrazioni di BIT (BIT1: 0.03 µg/L; BIT2: 0.3 µg/L) dopo un'ora di esposizione. I dati sono stati espressi come la media dei valori $\pm$ l'errore standard di minimo 15 cellule selezionate. I dati di controllo sono stati evidenziati dalla presenza del simbolo dei rombi "◆"; BIT1 da quello dei quadrati "■" e BIT2 dai triangoli "▲". Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. Lettere differenti nella legenda stanno ad indicare significatività differenti ($p < 0.05$).

Un andamento simile è emerso, poi, raggiunte le tre ore di esposizione (Figura 26). Anche in questo caso, come nel precedente, rispetto al gruppo di controllo è stato possibile osservare un permanente stato di rigonfiamento nelle cellule trattate con BIT1 al seguito del lavaggio in soluzione ipotonica e una perdita di volume progressivo, al seguito di un leggero rigonfiamento, nelle cellule trattate con BIT2. Queste ultime hanno raggiunto uno stato di raggrinzimento rispetto al volume di partenza al termine della fase sperimentale. Anche nel caso del secondo tempo di esposizione, come dimostratosi precedentemente per il T1, le cellule esposte a BIT2 hanno mostrato una significativa riduzione rispetto alle cellule di controllo ($p < 0.01$) e rispetto a quelle di BIT1 ($p < 0.01$).

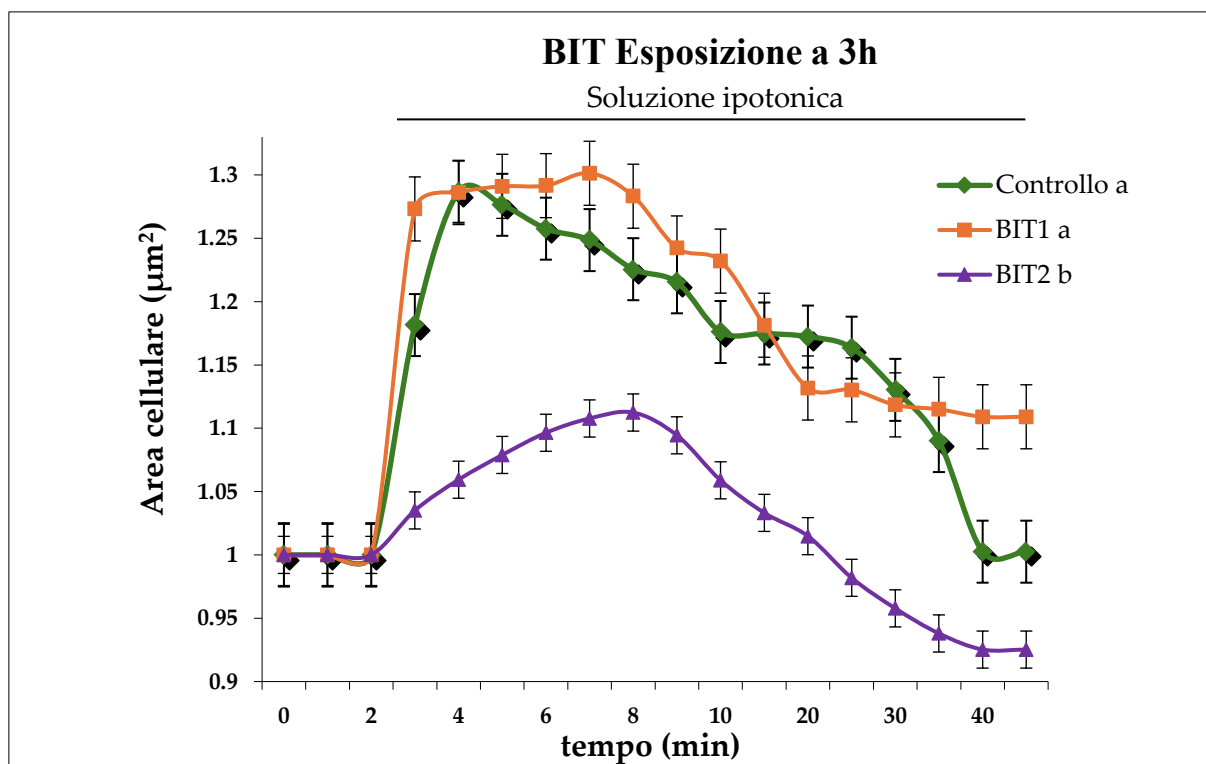


Fig. 26. Regolazione del Volume cellulare di cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* esposte a due concentrazioni di BIT (BIT1: 0.03 µg/L; BIT2: 0.3 µg/L) dopo tre ore di esposizione. I dati sono stati espressi come la media dei valori $\pm$ l'errore standard di minimo 15 cellule selezionate. I dati di controllo sono stati evidenziati dalla presenza del simbolo dei rombi "◆", BIT1 da quello dei quadrati "■" e BIT2 dai triangoli "▲". Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. Lettere diverse vanno ad indicare significatività diverse ($p < 0.05$).

4.3 Risultati esposizione al PEG

4.3.1 Invertebrati

I test sugli invertebrati mediante l'utilizzo del PEG sono stati effettuati sfruttando la taglia media del PEG (8000) e prendendo come organi bersaglio gli emociti, la DG e le branchie del mitilo. La scelta di testare il PEG Medium è avvenuta al seguito dei test effettuati sui vertebrati in cui sono invece state presi in esame gli effetti dati da tutte e tre le taglie di PEG scelte ai fini del presente lavoro. I risultati di seguito riportati sono stati oggetto di un articolo scientifico (Multisanti et al., 2024).



Article

From Personal Care to Coastal Concerns: Investigating Polyethylene Glycol Impact on Mussel's Antioxidant, Physiological, and Cellular Responses

Cristiana Roberta Multisanti ^{1,†}, Giorgia Zicarelli ^{2,†}, Alessia Caferro ³, Mariacristina Filice ^{3,*}, Caterina Faggio ^{2,4}, Irene Vazzana ⁵, Jana Blahova ⁶, Pavla Lakdawala ⁶, Maria Carmela Cerra ³, Sandra Imbrogno ^{3,*} and Federica Impellitteri ¹

¹ Department of Veterinary Sciences, University of Messina, 98168 Messina, Italy; cristiana.multisanti@studenti.unime.it (C.R.M.); federica.impellitteri@studenti.unime.it (F.I.)

² Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, 98166 Messina, Italy; giorgia.zicarelli@studenti.unime.it (G.Z.); caterina.faggio@unime.it (C.F.)

³ Department of Biology, Ecology and Earth Science, University of Calabria, 87036 Rende, Italy; alessia.caferro@unical.it (A.C.); maria_carmela.cerra@unical.it (M.C.C.)

⁴ Department of Ecosustainable Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, 80122 Naples, Italy

⁵ Zooprophyllactic Institute of Sicily, Via Gino Marinuzzi, 90129 Palermo, Italy; irene.vazzana@izssicilia.it

⁶ Department of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, 612 42 Brno, Czech Republic; blahovaj@vfu.cz (J.B.); lakdawalap@vfu.cz (P.L.)

* Correspondence: mariacristina.filice@unical.it (M.F.); sandra.imbrogno@unical.it (S.I.)

† These authors contributed equally to this work..

Vitalità cellulare

La vitalità cellulare degli emociti colorati mediante TB e NR ha messo in luce come, in entrambe le colorazioni, le cellule esposte ad E1 (0.1 mg/L) e ad E2 (10 mg/L) presentavano una diminuzione della vitalità cellulare a confronto di quella del gruppo

di controllo che al contrario ha fatto registrare una percentuale di vitalità emocitaria pari al 99% (TB) e al 99.9% (NR). Entrando nello specifico, gli emociti trattati con E2 hanno fatto osservare una evidente e significativa riduzione della loro vitalità rispetto agli emociti di controllo ($p < 0.01$) con il raggiungimento del minimo di vitalità pari al 94.3% (Tabella 6).

Tabella 6. Saggi di vitalità cellulare degli emociti e delle cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* trattate con due concentrazioni di PEG Medium (PEG1: 0.1 mg/L; PEG2: 10 mg/L) per quattordici giorni. I test sono stati condotti mediante l'utilizzo dei saggi colorimetrici Trypan Blu e Rosso Neutro.

Gruppi Sperimentali			
Saggio	Controllo	E1 (0.1 mg/L)	E2 (10 mg/L)
Vitalità Emociti			
Trypan Blu	99.0 ± 0.1	97.2 ± 1.0	94.3 ± 1.0**
Rosso Neutro	99.9 ± 0.6	97.6 ± 1.1	97.4 ± 1.0
Vitalità Ghiandola Digestiva			
Trypan Blu	98.7 ± 0.2	96.9 ± 1.0	93.3 ± 1.1**
Rosso Neutro	99.4 ± 0.3	97.3 ± 0.5*	97.9 ± 0.7

I risultati sono espressi come la media percentuale delle vitalità ± l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dall'applicazione del Tukey post hoc test. I risultati statisticamente significativi rispetto al gruppo di controllo sono stati scritti in grassetto ed evidenziati dalla presenza dell'asterisco "***" (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

L'andamento osservato per gli emociti è parzialmente riflesso anche nei risultati ottenuti per le cellule di DG. Infatti, quando analizzate mediante colorazione di TB entrambi i gruppi di epatociti (E1 e E2) hanno mostrato una riduzione rispetto alle cellule di controllo la cui vitalità è stata pari al 98.7%. In questo caso, le cellule colorate mediante TB hanno fatto emergere riduzioni della vitalità in entrambi i trattati con le cellule esposte a E2 che dopo i 14 giorni di trattamento riportavano una riduzione significativa ($p < 0.01$; vitalità pari al 93.3%) rispetto al gruppo di controllo. Al contrario, quando colorate mediante NR, la riduzione di vitalità è stata minore con

significatività rispetto al controllo ottenuta solo in E1 (vitalità del 97.3% $p < 0.05$). I dettagli delle percentuali di vitalità sono stati riportati nella Tabella 6.

Test dell'RVD

Per quanto concerne il test dell'RVD, l'esposizione a 14 giorni sia nel E1 che nel E2 non ha riportato a risultati statisticamente significativi. Ad emergere, ed osservabile mediante il grafico riportato in Figura 27, sono i differenti andamenti delle cellule del gruppo di controllo e dei trattati. Il gruppo di controllo ha, infatti, raggiunto il massimo punto di gonfiore ad IPO4 con una percentuale del 14.6% per poi vedere le cellule tornare al loro volume iniziale mentre, quelle dei due trattati, al contrario, hanno raggiunto tardivamente il punto di massimo gonfiore - seppur con percentuali maggiori rispetto a quelle di controllo - per poi, soprattutto nel caso di E2, non ritornare al loro volume iniziale. Entrando ancor più nello specifico, le cellule della DG che erano state trattate mediante E1 hanno raggiunto il massimo rigonfiamento, al seguito della somministrazione ipotonica, intorno ad IPO5 con una percentuale di incremento volumetrico pari al 16.8% rispetto a quello iniziale. Quelle trattate con E2, invece, hanno mostrato il picco di incremento volumetrico maggiore di tutti e tre i gruppi sperimentali raggiungendo il massimo intorno a IPO6 e una percentuale di incremento medio del 22.5%.

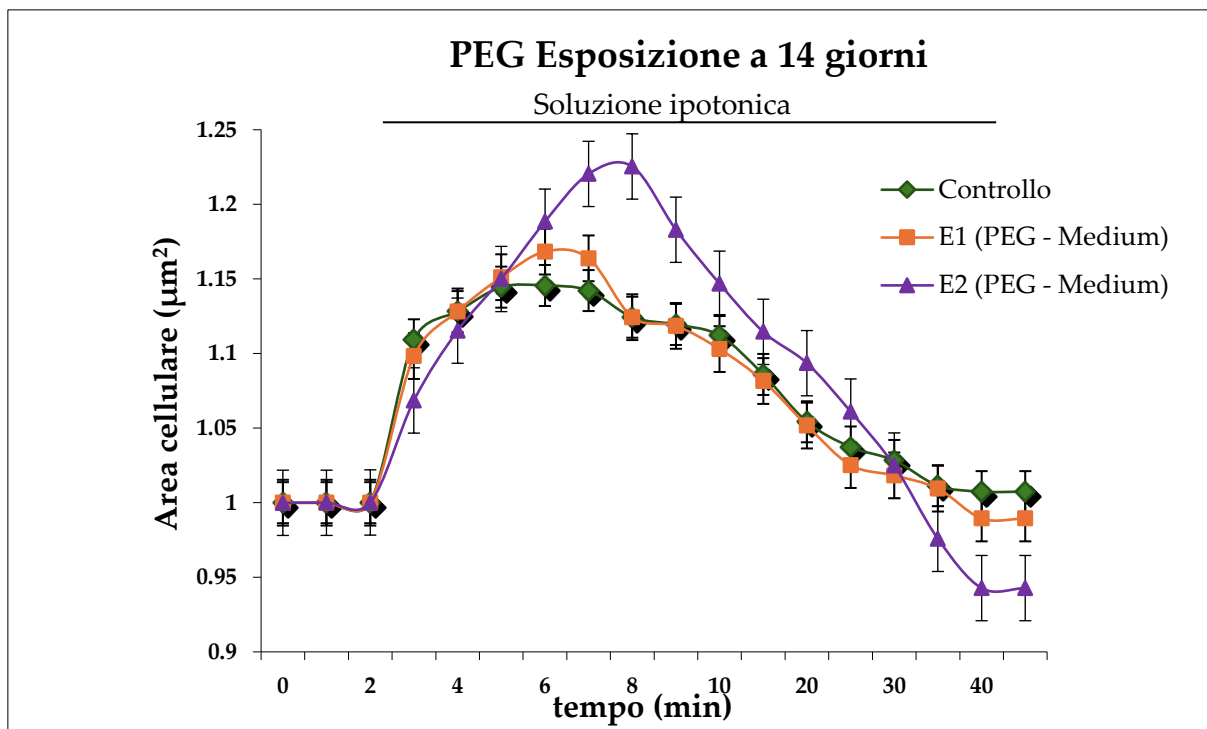


Fig 27. Regolazione del Volume cellulare di cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* esposte a due concentrazioni di PEG Medium (E1: 0.1 mg/L; E2: 10 mg/L). I dati sono stati espressi come la media dei valori $\pm$ l'errore standard di minimo 15 cellule selezionate. I dati di controllo sono stati evidenziati dalla presenza del simbolo dei rombi "◆", E1 da quello dei quadrati "■" e E2 dai triangoli "▲". Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. Non sono state osservate ed evidenziate differenze significative tra controllo e trattati.

Stress Ossidativo

Riguardo le analisi condotte sulla valutazione dello stress ossidativo, effettuate sulle branchie dei mitili trattate con PEG Medium, esse hanno mostrato un evidente e significativa riduzione dell'attività della SOD negli individui esposti alla più bassa delle concentrazioni ($p < 0.05$) mentre, i valori registrati nelle branchie degli animali trattati con E2 sono risultati essere simili a quelli ottenuti per il gruppo di controllo. L'LPO, invece, è incrementata in maniera significativa in risposta all'esposizione al PEG in entrambe le concentrazioni testate ($p < 0.05$). Tuttavia, nelle branchie degli individui trattati con E2, i livelli dei TBARS erano più bassi rispetto a quelli osservati nelle branchie degli individui trattati con E1 per quanto sempre più elevati rispetto al

controllo. Non sono emerse differenze significative per quanto concerne l'analisi degli OMP sia nei derivati aldeidici che nei derivati chetonici fra le tre condizioni sperimentali (Figura 28).

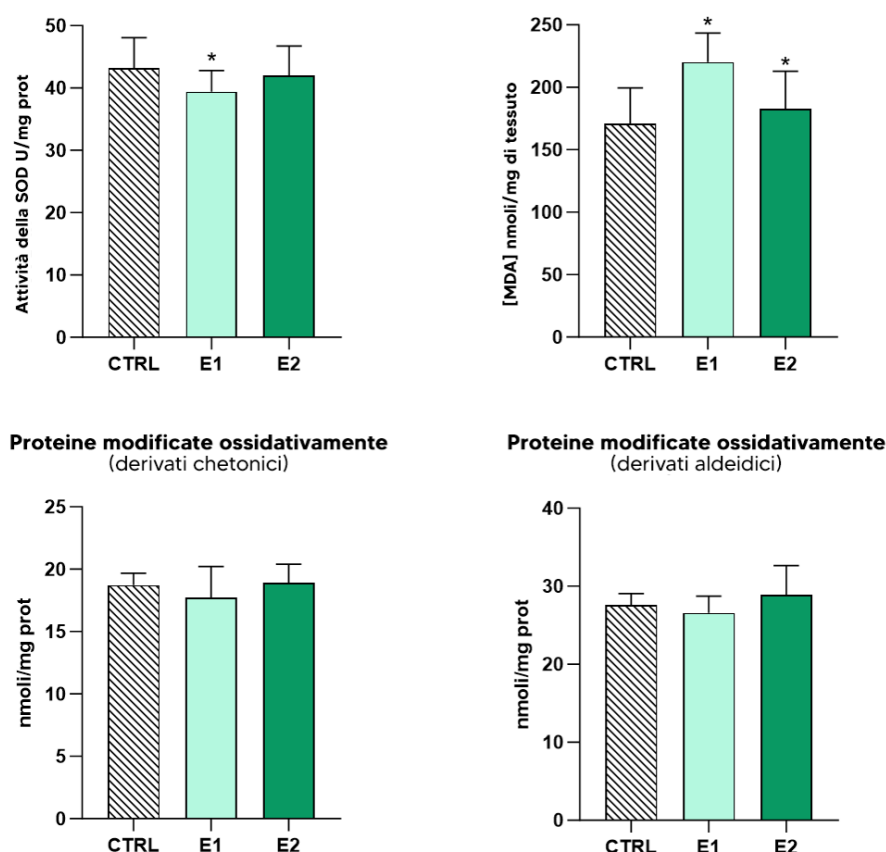


Fig. 28. Istogrammi sull'attività della SOD, dei TBARS e degli OMP all'interno delle branchie di *Mytilus galloprovincialis* esposte a due concentrazioni di PEG Medium (E1: 0.1 mg/L; E2: 10 mg/L). I dati sono stati espressi come il valore medio assoluto $\pm$ l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. I dati significativi sono stati messi in evidenza dalla presenza di un asterisco "*" (* $p < 0.05$).

Al contrario delle branchie, i risultati ottenuti dall'analisi dello stress ossidativo sui campioni di ghiandola digestiva, non hanno messo in luce significative differenze tra il gruppo di controllo e i trattati per quanto concerne l'attività della SOD e i livelli di OMP ma, hanno riportato un'unica significatività statistica nei livelli di TBARS dei molluschi esposti alla concentrazione di E1 che sono risultati essere incrementati

rispetto a quelli del gruppo di controllo ($p < 0.05$). Per assenza di frequenti variazioni significative i grafici non sono stati riportati all'interno del testo.

4.3.2 Vertebrati

I test sui vertebrati sono stati effettuati mediante l'utilizzo di embrioni di pesce zebra e xenopo. Nell'analisi di embrio-tossicità sul PEG sono stati utilizzate in parallelo tre diverse taglie di PEG (Low, Medium e High) testate sugli organismi in sette concentrazioni diverse per 96 ore di esposizione. I risultati, unitamente a quelli del PVA, sono stati descritti e riportati nell'articolo di Zicarelli et al., (2024a) in merito all'embriotossicologia dei vertebrati al seguito dell'esposizione a polimeri solubili.

Tassi di mortalità

Gli embrioni di danio zebrato, durante il tempo di osservazione, non hanno fatto registrare mortalità significative. Negli animali esposti alle concentrazioni di PEG Low e PEG Medium la percentuale maggiore di mortalità la si è ottenuta dopo 48 e 96 ore di esposizione ed è risultata essere pari al 4.2% degli embrioni totali. Invece, come riportato anche in Tabella 7, negli esemplari esposti al PEG High, durante tutto l'arco sperimentale, non è stata osservata alcuna mortalità all'interno degli embrioni di pesce zebra.

Tabella 7. Tasso di mortalità cumulativa espresso in % degli embrioni di *Danio rerio* e *Xenopus laevis* esposti a sette concentrazioni di PEG Low, Medium e High più un gruppo di controllo.

Mortalità Cumulativa (%)								
Gruppi	PEG Low							
	<i>Danio rerio</i>				<i>Xenopus laevis</i>			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	0	0	0	0	4.2	4.2	8.3
0.1 mg/L	0	0	0	0	12.5	16.7	25.0	29.2
0.5 mg/L	0	0	0	0	4.2	25.0	33.3*	37.5*

1 mg/L	0	0	0	0	4.2	8.3	12.5	12.5
5 mg/L	0	0	0	0	12.5	12.5	12.5	16.7
10 mg/L	0	0	0	4.2	16.8	20.8	20.8	25.0
50 mg/L	0	0	0	0	0	0	12.5	25.0
100 mg/L	0	0	0	0	8.3	8.3	16.7	25.0
PEG Medium								
Controllo	0	0	0	0	0	4.2	4.2	8.3
0.1 mg/L	0	0	0	0	8.3	12.5	12.5	16.7
0.5 mg/L	0	0	0	0	16.7	25.0	29.2*	33.3
1 mg/L	0	0	0	0	12.5	20.8	20.8	25.0
5 mg/L	0	4.2	4.2	4.2	12.5	20.8	20.8	29.2
10 mg/L	0	4.2	4.2	4.2	4.2	12.5	12.5	16.7
50 mg/L	0	0	0	0	20.8*	20.8	25.0	29.2
100 mg/L	0	0	0	0	12.5	16.7	16.7	20.8
PEG High								
Controllo	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	4.2
0.5 mg/L	0	0	0	0	0	0	4.2	4.2
1 mg/L	0	0	0	0	0	12.5	12.5	16.7
5 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	8.3
10 mg/L	0	0	0	0	0	4.2	4.2	4.2
50 mg/L	0	0	0	0	0	4.2	4.2	12.5
100 mg/L	0	0	0	0	0	12.5	12.5	12.5

I risultati sono espressi come la somma delle mortalità per la singola concentrazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I dati significativi ottenuti rispetto al gruppo di controllo sono stati evidenziati dal grassetto e dalla presenza di asterischi "***" (* $p < 0.05$).

Discorso inverso, può essere effettuato per gli embrioni di xenopo trattati con le tre taglie di PEG. In questo caso, infatti, le percentuali di mortalità nei trattati sono risultate essere più elevate rispetto a quelle descritte in precedenza. Il picco massimo è stato raggiunto dopo 96 ore di esposizione negli embrioni esposti a PEG Low nella concentrazione di 0.5 mg/L (37.5%) che hanno fatto registrare tassi di mortalità elevati rispetto al gruppo di controllo (Tabella 7). Nello specifico, gli embrioni di xenopo liscio esposti alla concentrazione di 0.5 mg/L di PEG Low e alle concentrazioni di 0.5 e 50 mg/L di PEG Medium presentavano delle mortalità statisticamente significative ($p <$

0.05). Come per gli embrioni di pesce zebra l'esposizione al PEG High non ha fatto registrare alcuna mortalità significativa.

Tassi di schiusa

Gli embrioni di pesce zebra hanno iniziato a schiudere, tranne che per un'unica eccezione, intorno alle 72 hpf. Gli embrioni del gruppo di controllo, durante l'osservazione alle 72 ore, hanno mostrato un tasso di schiusa pari al 12.5% del totale degli embrioni mentre, molti degli embrioni trattati con il PEG hanno mostrato significativi incrementi nel tasso di schiusa allo stesso tempo di osservazione (Figura 29). Entrando nello specifico, negli animali trattati con PEG Low risultati statisticamente significativi sono stati osservati dopo 72 ore nelle concentrazioni di 0.1 mg/L ($p < 0.05$); 0.5 e 50 mg/L ($p < 0.01$) e a 5 mg/L ($p < 0.001$); in quest'ultima concentrazione, inoltre, gli embrioni di danio zebrato hanno fatto registrare rispetto al gruppo di controllo il più alto tasso di schiusa pari al 70.8% degli embrioni testati. L'esposizione al PEG Medium ha mostrato una leggera significatività per gli embrioni trattati mediante le concentrazioni di 1 e 5 mg/L ($p < 0.05$) ed elevata per quelli trattati con le concentrazioni di 10, 50 e 100 mg/L ($p < 0.001$). La percentuale massima di schiusa è stata osservata dopo 72 ore negli embrioni esposti a 50 mg/L in cui l'87.5% degli embrioni era uscita dall'uovo. Infine, il pesce zebra tratto con il PEG High, ha fatto registrare incrementi nei tassi di schiusa in quasi tutte le concentrazioni selezionate; gli individui trattati con concentrazioni di 0.1 e 1 mg/L presentavano una bassa significatività ($p < 0.05$), quelli esposti a 0.5 e 100 moderata ($p < 0.01$) ed elevata negli individui a cui era stata somministrata la concentrazione di 50 mg/L ($p < 0.001$). Anche in questo caso il maggior tasso di schiusa è stato dell'87.5%.

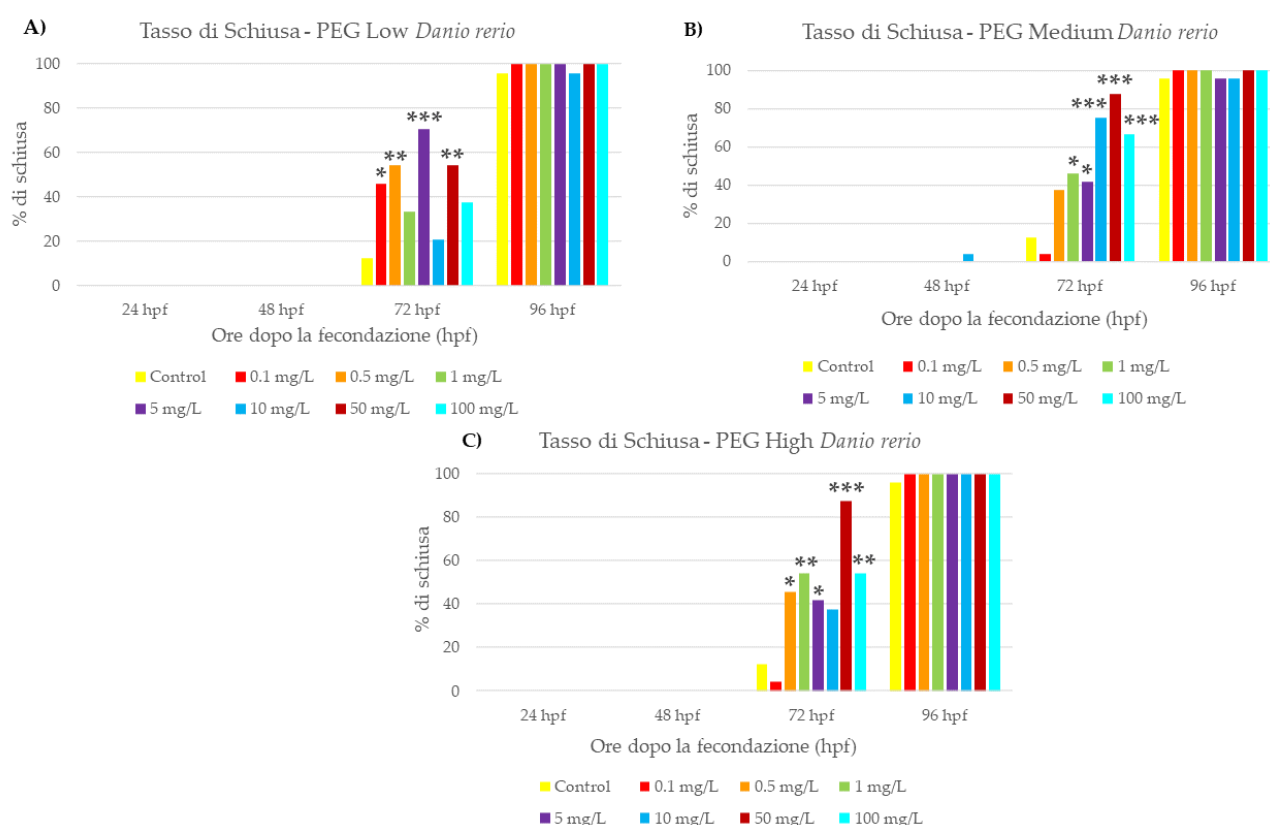


Fig. 29. Istogrammi dell'andamento di schiusa degli embrioni di *Danio rerio* esposti a differenti concentrazioni di PEG Low (Fig. 29A), Medium (Fig. 29B) e High (Fig. 29C) per 96 ore di osservazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I risultati sono espressi in percentuale e i dati significativi rispetto al gruppo di controllo sono evidenziati dalla presenza di asterischi "*" posti in corrispondenza della colonna in cui si è registrata la significatività (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$).

Gli esemplari di xenopo hanno riportato un'unica significatività alla concentrazione di 50 mg/L in PEG Low ($p < 0.05$). In questo caso dopo 48 hpf una percentuale maggiore di embrioni era uscita dalla seconda membrana dell'uovo rispetto agli embrioni del gruppo di controllo. I restanti risultati ottenuti per le concentrazioni test rispetto al gruppo di controllo sono stati invariati e non significativi e pertanto non sono stati riportati graficamente.

Comparsa e valutazione malformazioni

Gli esperimenti condotti sugli embrioni di pesce zebra hanno permesso di osservare come al crescere della concentrazione testata e della taglia della sostanza, l'incidenza nel numero di malformazioni presenti sugli esemplari cresceva in maniera progressiva. Quel che è emerso dalle analisi è stata una correlazione dose e tempo dipendente (Tabella 8). La percentuale massima di malformazioni è stata ottenuta negli embrioni esposti a PEG Medium e PEG High nella concentrazione di 100 mg/L dopo 96 ore di trattamento pari al 41.7% degli embrioni totali malformati (in entrambi i trattati). Le malformazioni più comunemente osservate sono state: riduzione o incremento della pigmentazione, edema, deformazioni della colonna vertebrale e della pinna caudale e modificazione nella lunghezza stessa della pinna caudale. Gli embrioni esposti al PEG Low non hanno riportato percentuali di malformazioni significative in rispetto al gruppo di controllo. Significatività che, al contrario, sono state osservate in quasi tutte le concentrazioni testate dopo 96 ore di trattamento sia negli embrioni di danio zebrato esposti a PEG Medium che a quelli esposti a PEG High ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$).

Tabelle 8. Presenza di malformazioni cumulativa espressa in percentuale (%) degli embrioni di *Danio rerio* e *Xenopus laevis* esposti a sette concentrazioni di PEG Low, Medium e High più un gruppo di controllo.

Presenza di Malformazioni								
Gruppi	PEG Low							
	<i>Danio rerio</i>				<i>Xenopus laevis</i>			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	0	0	0	0	0	8.3	12.5
0.1 mg/L	0	4.2	4.2	4.2	0	29.2*	20.8	20.8
0.5 mg/L	0	0	0	0	0	20.8**	37.5*	37.5*
1 mg/L	0	0	0	0	0	20.8**	20.8	33.3
5 mg/L	0	4.2	4.2	8.3	0	4.2	16.7	20.8
10 mg/L	0	4.2	4.2	4.2	0	4.2	25.0	29.2
50 mg/L	0	0	0	4.2	0	8.3	37.5*	37.5*
100 mg/L	0	8.3	8.3	12.5	0	12.5	29.2	29.2
PEG Medium								

Controllo	0	0	0	0	0	0	8.3	12.5
0.1 mg/L	0	0	0	8.3	8.3	20.8*	20.8	20.8
0.5 mg/L	0	0	0	20.8*	8.3	12.5	37.5*	37.5*
1 mg/L	0	0	4.2	20.8*	4.2	8.3	20.8	33.3
5 mg/L	0	12.5	16.7	33.3**	0	0	16.7	20.8
10 mg/L	0	4.2	12.5	29.2**	4.2	12.5	25.0	29.2
50 mg/L	0	0	12.5	33.3**	4.2	12.5	37.5*	37.5*
100 mg/L	0	16.7	20.8*	41.7***	4.2	12.5	29.2	29.2
PEG High								
Controllo	0	0	0	0	0	12.5	16.7	16.7
0.1 mg/L	0	16.7	16.7	25.0*	0	8.3	12.5	16.7
0.5 mg/L	0	8.3	8.3	25.0*	0	16.7	29.2	41.7
1 mg/L	0	4.2	4.2	29.2**	0	12.5	20.8	29.2
5 mg/L	0	8.3	8.3	12.5	0	25.0	29.2	50.0*
10 mg/L	0	4.2	12.5	29.2**	0	4.2	20.8	29.2
50 mg/L	0	4.2	8.3	20.8*	0	25.0	33.3	37.5
100 mg/L	0	8.3	8.3	41.7***	0	8.3	25.0	25.0

I risultati sono espressi come la somma delle malformazioni per singola concentrazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I dati significativi ottenuti rispetto al gruppo di controllo sono stati evidenziati dal grassetto e dalla presenza di asterischi "" (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Per quanto concerne i risultati ottenuti dall'esposizione alle tre taglie di PEG nelle rane, le principali malformazioni osservate sono state: malformazioni del corpo, mancato sviluppo di organi, malformazioni della testa, mancato sviluppo della coda, edema, deformazioni nella colonna vertebrale e della coda oltre che un'alterazione della pigmentazione (Figura 30). Rispetto al danio zebrato gli embrioni di xenopo hanno presentato un maggior numero di malformazioni con una percentuale di incidenza massima registrata dopo 96 ore di esposizione negli esemplari trattati con PEG High nella concentrazione di 5 mg/L in cui il 50% degli individui sul totale è apparso essere malformato. Altre malformazioni significative sono state anche osservate nelle concentrazioni di 0.1, 0.5, 1 e 50 mg/L di PEG Low ($p < 0.05$) e nelle concentrazioni di 0.1, 0.5 e 50 mg/L di PEG Medium ($p < 0.05$).



Fig. 30. Esempi di malformazioni subentrate in embrioni di *Danio rerio* esposti a una concentrazione di 5 mg/L di PEG High dopo 72 ore (Fig. 28A) e in embrioni di *Xenopus laevis* esposto a concentrazione di 0.5 mg/L di PEG Low dopo 96 ore (Fig. 28B). In figura sono visibili malformazioni a carico della colonna vertebrale (incurvata), riduzione della lunghezza totale dell'animale, edema pericardici, malformazioni fisiche dell'intera struttura corporea (nel caso di *Xenopus*) con alterazioni a livello dello stomaco, della cavità boccale e della coda.

Frequenza Cardiaca

La frequenza cardiaca, calcolata come il numero di battiti al minuto, è risultata essere alterata in entrambi gli animali presi in esame in tutte e tre le differenti taglie di PEG prese in considerazione (Tabella 9). Dai test è emerso come l'esposizione a PEG Low nei pesci zebra portasse a un'accelerazione del numero di battiti rispetto a quelli osservati negli individui di controllo con significatività registrate per le concentrazioni di 5 ($p < 0.01$), 10 e 50 mg/L ($p < 0.05$). Al contrario, una riduzione del numero di battiti al minuto è stata osservata negli embrioni di danio zebrato che erano esposti a PEG Medium e PEG High. A queste concentrazioni, infatti, i pesci zebra hanno mostrato significatività ($p < 0.05$; $p < 0.01$ e $p < 0.001$) in tutte le concentrazioni scelte ai fini sperimentali fatta eccezione per gli individui esposti a 0.5 mg/L di PEG Medium in cui

è stata osservata una riduzione (173.2 battiti/min), ma non è risultata essere significativa in relazione al controllo (188.4 battiti/min).

Tabella 9. Frequenza cardiaca degli embrioni di *Danio rerio* e *Xenopus laevis* esposti a sette concentrazioni di PEG Low, PEG Medium e PEG High.

Frequenza cardiaca (numero battiti/min.)		
<i>PEG - LOW</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Control	169.9 ± 3.1	110.8 ± 3.2
0.1 mg/L	166.8 ± 3.5	122.7 ± 4.8
0.5 mg/L	180.4 ± 4.7	120.5 ± 3.3
1 mg/L	180.5 ± 5.5	130.4 ± 3.5**
5 mg/L	197.2 ± 4.5**	127.4 ± 2.9**
10 mg/L	204.6 ± 8.9*	128.3 ± 2.3**
50 mg/L	193.7 ± 5.2*	127.8 ± 2.2**
100 mg/L	157.7 ± 3.4	124.5 ± 2.1
<i>PEG- MEDIUM</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Control	188.4 ± 4.1	110.8 ± 3.2
0.1 mg/L	158.2 ± 3.2**	125.1 ± 3.7*
0.5 mg/L	173.2 ± 3.8	120.8 ± 5.2**
1 mg/L	159.4 ± 4.0*	119.5 ± 3.3
5 mg/L	152.4 ± 2.3**	115.1 ± 3.5
10 mg/L	144.6 ± 3.2***	117.5 ± 3.3
50 mg/L	158.8 ± 3.3*	121.2 ± 2.0*
100 mg/L	147.6 ± 3.4***	113.8 ± 2.5
<i>PEG - HIGH</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Control	131.1 ± 2.5	104.3 ± 2.7
0.1 mg/L	112.8 ± 3.0***	108.5 ± 5.1
0.5 mg/L	120.3 ± 2.3*	115.4 ± 3.5
1 mg/L	115.1 ± 1.4***	117.7 ± 3.4
5 mg/L	106.2 ± 4.4**	123.0 ± 4.2*
10 mg/L	108.6 ± 3.7***	130.0 ± 2.7***

50 mg/L	105.5 ± 2.0***	137.1 ± 3.8***
100 mg/L	110.0 ± 2.0***	134.4 ± 2.4***

I dati sono espressi come la media dei valori registrati $\pm$ l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del Kruskal-Wallis test seguito dal Dunn's post hoc test. I dati risultati essere statisticamente significativi rispetto al gruppo di controllo sono evidenziati dall'utilizzo del grassetto e degli asterischi "***" (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Per quanto concerne la frequenza cardiaca osservata negli embrioni di xenopo, i risultati ottenuti sono stati opposti a quelli precedentemente ottenuti negli embrioni di pesce zebra. Infatti, gli embrioni trattati con PEG Low mostravano un decremento del numero di battiti al minuto rispetto al controllo (Tabella 9) con risultati significativi negli organismi esposti alle concentrazioni di 1, 5, 10 e 50 mg/L ($p < 0.01$) e al contrario, quelli esposti a PEG Medium e PEG High mostravano un incremento rispetto ai battiti al minuto osservati nel gruppo di controllo. Significatività, infine, per queste due sostanze sono state osservate nelle concentrazioni di 0.1, 0.5 e 50 mg/L ($p < 0.05$; $p < 0.01$ – PEG Medium) e in 5, 10, 50 e 100 mg/L ($p < 0.05$; $p < 0.001$ – PEG High).

Lunghezza media

L'alterazione della lunghezza al seguito dell'esposizione al PEG è stata osservata negli embrioni di danio zebrato esposti a PEG High ($p < 0.05$) alla concentrazione di 100 mg/L e negli embrioni di xenopo nelle concentrazioni di 10 e 50 mg/L PEG High. Per l'assenza di importanti significatività i dati in merito alla lunghezza non sono stati riportati.

4.4 Risultati esposizione al SLS

4.4.1 Invertebrati

I campioni di mitilo, al seguito della grande quantità di studi in merito agli effetti che un'esposizione all'SLS ha su questi animali, sono stati esposti a una sola concentrazione di SLS e al suo mix con l'estratto di bucce di bergamotto (BRG) per poter verificare se la presenza dell'estratto in questione potesse avere capacità nutraceutiche nei confronti dell'SLS. Il lavoro ha così permesso di osservare l'interazione e gli eventuali benefici della co-presenza in ambiente acquatico dei due composti così da proporre i nutraceutici naturali come possibili aggiunte all'interno della formulazione dei PCPs per salvaguardare le comunità non-bersaglio. Gli esemplari sono stati esposti *in vivo* per 14 giorni al fine dei quali sono state valutate alterazioni della vitalità cellulare, l'attività fagocitica e l'RVD. Lo studio in questione è descritto nel dettaglio nell'articolo scientifico: "Bergamot (*Citrus bergamia*) as a potential anti-stress agent: counteracting physiological and cellular changes by Sodium Lauryl Sulphate in *Mytilus galloprovincialis*" – Multisanti, C.R., Riolo. K., Impellitteri, F., Zicarelli, G., Vazzana, I., Cafeo, G., Russo, M., Dugo, P., Faggio C., Giannetto, A., 2024. Attualmente sottomesso nella rivista scientifica *Environmental Pollution*.

Vitalità cellulare

I test effettuati mediante colorazione TB e NR hanno fatto emergere come l'esposizione all'SLS porti a una riduzione significativa della vitalità cellulare sia negli emociti che negli epatociti. Entrando nello specifico (Tabella 10), gli emociti trattati con SLS presentavano una riduzione della vitalità statisticamente significativa ($p < 0.01$) rispetto al gruppo di controllo nel saggio del TB e rispetto agli emociti delle cozze trattate con BRG ($p < 0.05$). Nessun risultato significativo è stato osservato nelle cellule

emolinfatice testate mediante colorazione NR in cui è comunque presente una minima riduzione di vitalità nell'esposizione ad SLS.

Tabella 10. Saggi di vitalità cellulare degli emociti e delle cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* trattate con una concentrazione di SLS (0.01 mg/L), una di estratto di bucce di bergamotto (BRG 5 mg/L) e il loro mix (SLS 0.01 mg/L; BRG 5 mg/L) per quattordici giorni. I test sono stati condotti mediante l'utilizzo dei saggi colorimetrici Trypan Blu e Rosso Neutro.

	Gruppi Sperimentali			
Saggio	Controllo	SLS (0.01 mg/L)	BRG (5 mg/L)	Mix (0.01 + 5 mg/L)
	Vitalità Emociti			
Trypan Blu	98.5 ± 0.5 ^a	93.5 ± 0.8 ^b	97.2 ± 0.8 ^a	96.0 ± 0.9 ^a
Rosso Neutro	97.4 ± 0.7	97.3 ± 0.7	99.2 ± 0.4	97.6 ± 1.0
	Vitalità Ghiandola Digestiva			
Trypan Blu	98.5 ± 0.3	97.8 ± 0.5	98.8 ± 0.2	98.7 ± 0.3
Rosso Neutro	98.9 ± 0.2 ^a	97.5 ± 0.4 ^b	98.7 ± 0.2 ^a	99 ± 0.2 ^a

I risultati sono espressi come la media percentuale delle vitalità ± l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dall'applicazione del Tukey post hoc test. A risultati significativi diversi corrispondono lettere diverse e sono stati esplicitati mediante scritte in grassetto ($p < 0.05$).

Risultati analoghi a quelli ottenuti per gli emociti sono stati ben visibili anche nelle cellule di DG (Tabella 10). Negli epatociti saggiati mediante colorazione TB quelli del gruppo di controllo, del gruppo BRG e del Mix hanno mostrato percentuali di vitalità comparabili e non significative fra loro. Leggera diminuzione della vitalità è stata osservata per entrambe le colorazioni, invece, nelle cellule degli organismi esposti ad SLS. Riduzione risultata essere poi significativa rispetto agli altri tre gruppi sperimentali quando colorati mediante NR ($p < 0.01$; $p < 0.05$; $p < 0.01$).

Attività di fagocitosi

L'alterazione nella capacità di inglobare lieviti è risultata alterata in modo diverso nelle differenti concentrazioni come riportato nella Figura 31. La percentuale di emociti in

grado di effettuare la fagocitosi nel controllo è stata pari al 93.4% delle cellule totali. Tale percentuale ha subito un drastico e significativo decremento con gli emociti degli esemplari trattati mediante SLS che presentavano un'attività fagocitaria solo del 29.5% ($p < 0.01$). Al contrario, una percentuale simile e confrontabile con quella osservata nel gruppo di controllo è stata vista per le cellule degli esemplari di mitilo trattati mediante BRG. Infatti, per questi animali la capacità di effettuare fagocitosi da parte delle cellule si è mantenuta del 91.3% e, pertanto, non è stata evidenziato alcun risultato significativo ($p > 0.05$). Infine, come già osservato per la vitalità cellulare nel Mix si è osservato un andamento intermedio delle cellule che mostravano percentuali di attività fagocitaria a metà tra quelli osservati nel gruppo esposto a BRG e quelle osservate nel gruppo trattato mediante SLS. In questo caso, infatti, l'attività registrata è stata pari al 74.3% delle cellule totali presentando pertanto una differenza statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.01$). Differenze significative sono anche state osservate, inoltre, tra i trattati. Nello specifico, come osservabile dall'immagine sottostante, la riduzione di vitalità osservata nel gruppo SLS è stata significativa sia quando essa è stata comparata alle cellule dei mitili esposte al solo BRG che in quelle esposte al Mix ($p < 0.01$). Ma, allo stesso tempo, la comparazione tra il Mix e il BRG ha messo in luce una riduzione significativa con le cellule del Mix alterate nell'abilità di effettuare fagocitosi rispetto a quelle del BRG ($p < 0.01$).

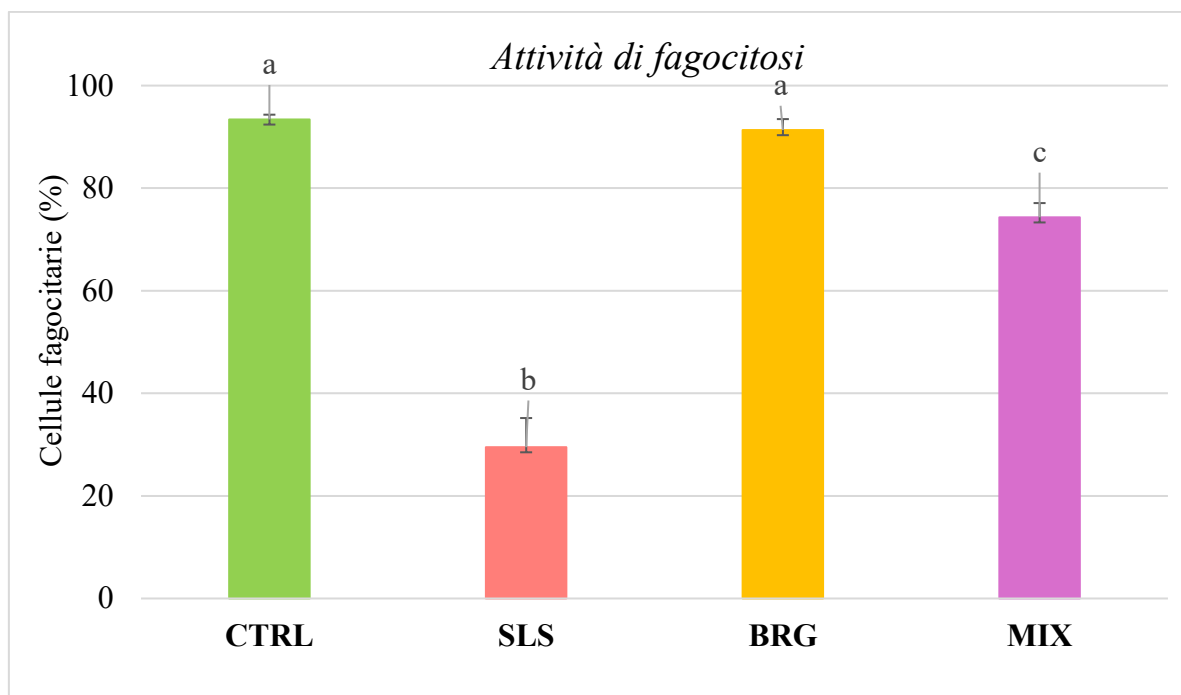


Fig. 31. Istogrammi sull'attività fagocitaria degli emociti di *Mytilus galloprovincialis* esposte a una concentrazione di SLS, una di estratto di buccia di bergamotto (BRG) e il loro Mix (SLS 0.01 mg/L; BRG 5 mg/L). Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. I dati sono stati espressi mediante percentuale delle cellule che hanno effettuato la fagocitosi. A risultati significativi corrispondono lettere diverse ($p < 0.05$).

Test dell'RVD

Il test di RVD non ha riportato alcun risultato significativo ma, analogamente alla vitalità delle cellule di DG, l'esposizione all'SLS e al Mix hanno mostrato delle alterazioni rispetto al gruppo di controllo e al gruppo di esemplari esposti al solo BRG (Figura 32). Entrando più nello specifico, infatti, le cellule di mitilo del controllo hanno mostrato un incremento del loro volume del 23.0% il cui picco è stato raggiunto durante IPO6 con un ritorno al valore iniziale al termine della prova di RVD. Quelle trattate con bergamotto, seppur siano tornate anch'esse al loro volume, iniziale al seguito della somministrazione della soluzione ipotonica, hanno mostrato un incremento volumetrico solo del 13.2% raggiungendo il picco di massimo rigonfiamento precocemente rispetto al gruppo di controllo (IPO3). Per quanto concerne i mitili trattati con SLS e il Mix, invece, le cellule hanno mostrato percentuali

di incremento del proprio volume cellulare a metà tra quelli ottenuti nel gruppo di controllo e nel gruppo esposto a BRG (21.0% e 17.0% rispettivamente raggiunti a IPO5 e IPO4), ma per, entrambi i casi, al seguito del rigonfiamento si è assistito a un raggrinzimento cellulare con le cellule di DG esposte ad SLS e al Mix non in grado di recuperare il loro volume originale. Dalla Figura 32, però, è ben visibile come le cellule del Mix presentino un raggrinzimento inferiore rispetto a quello osservabile nelle cellule di SLS con un parziale recupero dal danno rispetto a queste ultime.

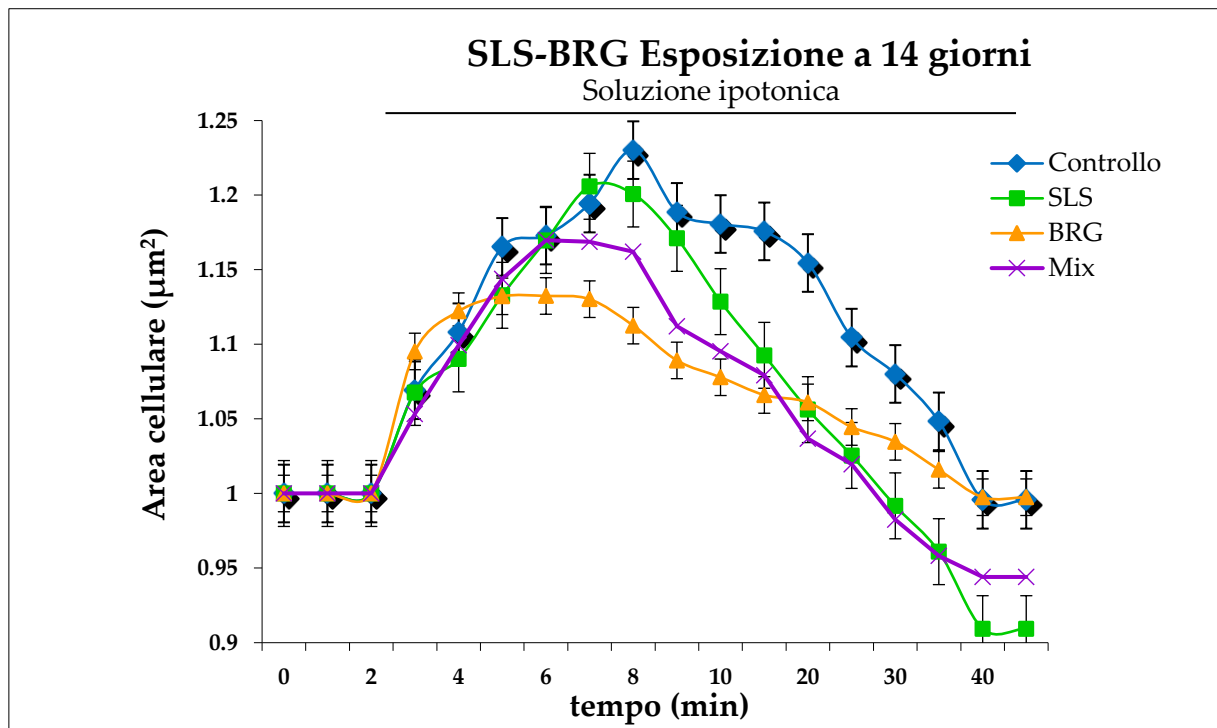


Fig. 32 Regolazione del Volume cellulare di cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* esposte a una concentrazione di SLS, una di estratto di buccia di bergamotto (BRG) e il loro Mix (SLS 0.01 mg/L; BRG 5 mg/L). I dati sono stati espressi come la media dei valori $\pm$ l'errore standard di minimo 15 cellule selezionate. I dati di controllo sono stati evidenziati dalla presenza del simbolo dei rombi "◆", SLS "■" da quello dei quadrati, BRG dai triangoli "▲" e il mix da delle "x". Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. Non sono state osservate ed evidenziate differenze significative tra controllo e trattati.

4.4.2 Vertebrati

I test di embriotossicità sui vertebrati sono stati condotti sugli embrioni di carpa, pesce zebra e xenopo con lo scopo di aumentare le conoscenze che in letteratura risultano datate o inesistenti in merito a questo subphylum. L'SLS è stato testato in sei diverse concentrazioni partendo da percentuali vicine a quelle in natura e nel range dell'LC₅₀ riportato dai diversi studi. I risultati ottenuti, anche in questo caso, hanno portato alla stesura di un lavoro scientifico di Zicarelli et al., (2024b).

Effects of a Common Surfactant Sodium Lauryl Sulfate on Early Life Stages of Two Fish and One Amphibian Species

Giorgia Zicarelli · Federica Impellitteri · Caterina Faggio^{ID} · Jana Blahova · Zdenka Svobodova ·
Renata Hesova · Barbora Riesova · Michaela Frederika Vargova · Giuseppe Piccione ·
Cristiana Roberta Multisanti · Pavla Lakdawala

Tassi di mortalità

La mortalità dei tre organismi modello, monitorata ogni 24 ore, è stata riassunta nella Tabella 11 e ha restituito risultati differenti nelle tre specie. Fra le specie di Cyprinidae, infatti, le carpe non hanno mostrato alcuna mortalità nelle concentrazioni maggiori scelte ai fini sperimentali (5, 10 e 15 mg/L) e hanno riportato mortalità molto basse e non significative nelle concentrazioni minori (0.1, 0.5 e 1 mg/L) con la percentuale di mortalità massima pari a 8.3% degli organismi totali. Al contrario, nei pesci zebra, le percentuali minori di mortalità sono state osservate nelle tre concentrazioni minori mentre, nelle concentrazioni maggiori, è stato osservato un incremento progressivo della mortalità con l'aumentare della concentrazione sino al raggiungimento del 100% degli individui morti dopo 24 ore di esposizione nelle concentrazioni di 10 e 15 mg/L ($p < 0.001$).

Tabella 11. Tasso di mortalità cumulativa espresso in % degli embrioni di *Cyprinus carpio* e *Danio rerio* esposti a sei concentrazioni di SLS più un gruppo di controllo.

Mortalità Cumulativa (%)								
Gruppi	SLS							
	<i>Cyprinus carpio</i>				<i>Danio rerio</i>			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	0	0	4.2	0	0	0	0
0.1 mg/L	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3
0.5 mg/L	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	8.3	8.3	8.3
1 mg/L	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	8.3	8.3	8.3
5 mg/L	0	0	0	0	0	33.3**	33.3**	33.3**
10 mg/L	0	0	0	0	0	100.0***	100.0***	100.0***
15 mg/L	0	0	0	0	0	100.0***	100.0***	100.0***

I risultati sono espressi come la somma delle mortalità per la singola concentrazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I dati significativi ottenuti rispetto al gruppo di controllo sono stati evidenziati dal grassetto e dalla presenza di asterischi "" (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Per quanto concerne i risultati ottenuti dai test condotti sugli embrioni di xenopo, invece, i soli risultati significativi sono stati osservati nelle concentrazioni di 10 e 15 mg/L ($p < 0.05$ e $p < 0.01$) dopo 48 ore di esposizione. La percentuale maggiore di mortalità è stata quella del 45.8% negli esemplari trattati con SLS 15 mg/L dopo 96 ore di esposizione. A causa dell'ottenimento di pochi risultati significativi i dati non sono stati riportati in tabella.

Tassi di schiusa

I tassi di schiusa per le carpe sono risultati inalterati in tutte le concentrazioni testate con percentuali vicine al 100% e paragonabili a quelle osservate nel controllo. Anche nei pesci zebra, fatta eccezione per le concentrazioni maggiori a cui si era registrato un elevato tasso di mortalità, la schiusa non è risultata alterata rispetto al numero di individui osservati schiudere nel controllo. Unica significatività è stata osservata al raggiungimento delle 96 hpf negli individui di danio zebrato esposti a 5 mg/L ($p < 0.001$) i cui gli embrioni hanno mostrato una velocità di schiusa ritardata rispetto alla

percentuale di individui nel controllo che dopo tale arco di tempo risultavano aver completato la schiusa. Alla luce dei risultati ottenuti, i dati in merito alle percentuali di schiusa dei ciprinidi non sono stati riportati graficamente.

Al contrario, gli anfibi trattati con SLS hanno mostrato segni di schiusa dalla seconda membrana dell'uovo già dopo 48 ore con un risultato significativo (Figura 33) nella concentrazione di 1 mg/L dove è visibile un ritardo con solo il 45.8% degli embrioni schiusi in opposizione a un controllo che vedeva usciti dall'uovo, dopo questo arco di tempo, il 79.2% degli embrioni testati ($p < 0.05$). Durante le osservazioni effettuate alle 72 e alle 96 ore sono poi state registrate significatività anche nelle concentrazioni di 10 e 15 mg/L in cui la schiusa si è fermata rispettivamente al 66.2% e 58.3% degli individui totali testati ($p < 0.05$; $p < 0.01$) rispetto agli individui del controllo che hanno raggiunto il tasso di schiusa del 95.8%.

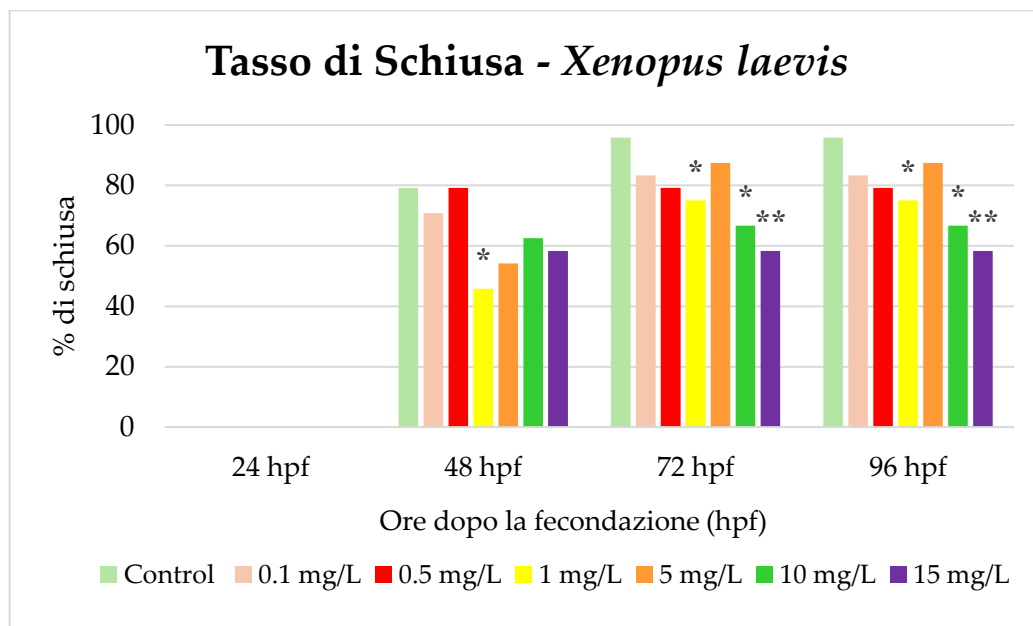


Fig. 33. Istogramma dell'andamento di schiusa degli embrioni di *Xenopus laevis* esposti a differenti concentrazioni di SLS per 96 ore di osservazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I risultati sono espressi in percentuale (%) e i dati significativi rispetto al controllo sono evidenziati dalla presenza di asterischi "*" posti in corrispondenza della colonna in cui si è registrata la significatività (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$).

Comparsa e valutazione malformazioni

La percentuale di malformazioni osservata negli embrioni di carpa è stata nulla o quasi nulla. La massima percentuale di individui malformati è stata ottenuta negli individui esposti alla concentrazione di 15 mg/L di SLS in cui solo il 12.5% degli embrioni presentava alterazioni non risultando in alcuna significatività rispetto al gruppo di controllo. Tra queste le malformazioni più osservate sono state: la comparsa di ematomi e di edemi. Poche malformazioni sono state visibili anche negli individui di pesce zebra con un unico risultato statisticamente significativo osservato negli individui esposti a 5 mg/L ($p < 0.01$) in cui il 37.5% degli embrioni presentava una malformazione al termine del periodo di esposizione. Queste erano principalmente: edema pericardici, deformazioni della pinna e della colonna vertebrale (Figura 34).

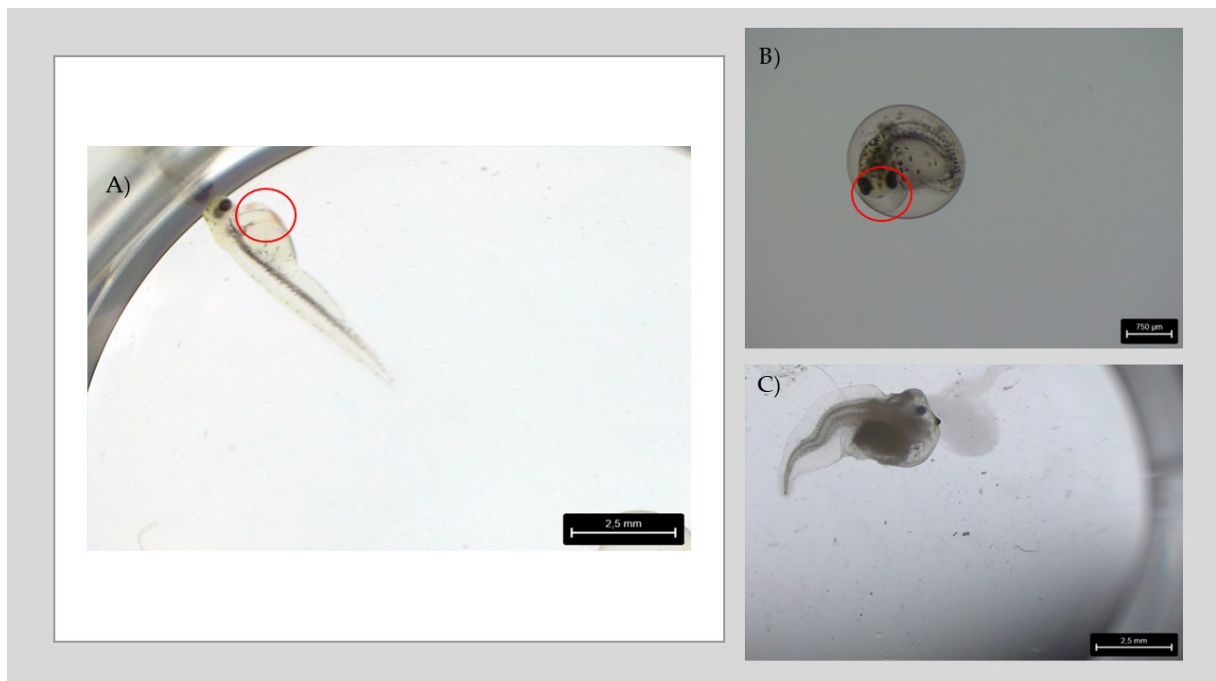


Fig. 34. Esempi di malformazioni in embrioni di *Cyprinus carpio* esposto a una concentrazione di 15 mg/L di SLS dopo 72 ore (Fig. 34A), di *Danio rerio* esposto a una concentrazione di 5 mg/L di SLS dopo 72h (Fig. 34B) e di *Xenopus laevis* esposto a una concentrazione di 15 mg/L di SLS dopo 96h (Fig. 34C). Nella figura sono visibili la presenza di un ematoma messo in evidenza all'interno del cerchio rosso (34A), un edema pericardico, un esemplare di zebrafish non schiuso dopo 72h e infine malformazioni a carico dell'intera struttura corporea con curvatura della colonna vertebrale, riduzione della lunghezza totale e edema pericardici.

Risultati significativi nell'incidenza di malformazioni, invece, sono stati osservati già dopo 24 ore di esposizione negli individui di rana nelle concentrazioni di 1, 5 e 10 mg/L in cui le percentuali di comparsa delle malformazioni sono state rispettivamente 20.8, 41.7 e 25% ($p < 0.05$; $p < 0.001$ e $p < 0.05$). Le percentuali di individui malformati sono poi andate crescendo con il crescere del tempo di esposizione sino alle 96 ore in cui gli individui esposti a concentrazioni di 1, 5 e 15 mg/L mostravano delle percentuali di individui malformati oltre il 50% degli individui totali ($p < 0.05$; $p < 0.001$ e $p < 0.05$). La percentuale massima di malformazioni è stata riportata per gli individui esposti alla concentrazione di 5 mg/L in cui il 70.8% presentava malformazioni. Le principali malformazioni registrate per gli organismi di xenopo trattati con SLS sono state: malformazioni del corpo, della colonna vertebrale e della coda con riduzione della lunghezza di quest'ultima; alterazione della pigmentazione e deformità a carico della testa (Figura 34). Le percentuali di malformazioni ottenute negli embrioni di xenopo sono state riassunte nella tabella 12.

Tabella 12. Presenza di malformazioni espresse in percentuale (%) degli embrioni di *Xenopus laevis* esposti a sei concentrazioni di SLS più un gruppo di controllo.

Gruppi	Presenza di Malformazioni			
	SLS			
	<i>Xenopus laevis</i>			
	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	0	8.33	12.5
0.1 mg/L	12.5	25	25	29.2
0.5 mg/L	16.7	16.7	25.0	33.3
1 mg/L	20.8*	37.5**	45.8**	54.2**
5 mg/L	41.7***	50.0***	62.5***	70.8***
10 mg/L	25.0*	37.5**	37.5*	37.5
15 mg/L	16.7	45.8***	50.0**	54.2**

I risultati sono espressi come la somma delle malformazioni per singola concentrazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I dati significativi ottenuti rispetto al gruppo di controllo sono stati evidenziati dal grassetto e dalla presenza di asterischi "" (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Frequenza cardiaca

Un'alterazione nella frequenza cardiaca è stata visibile in quasi tutte le concentrazioni testate sui Cyprinidae (Tabella 13). In generale sia le carpe che i pesci zebra hanno mostrato significativi decrementi nel numero di battiti al minuto a confronto con i battiti registrati nel gruppo di controllo. Le carpe di controllo, infatti, presentavano un numero di battiti medio pari a 224.9 (battiti/min), valore diminuito al crescere della concentrazione fino a raggiungere il valore minimo di 137.5 (battiti/min) nella concentrazione di 15 mg/L ($p < 0.001$). Andamento dose/dipendente è stato ottenuto anche negli embrioni di danio zebrato che alla concentrazione di 5 mg/L presentavano un minimo di battiti significativo pari a 122.2 (battiti/min; $p < 0.001$). Per quanto concerne i risultati ottenuti negli embrioni di xenopo esposti ad SLS, è stata osservata una riduzione della frequenza cardiaca in quasi tutte le concentrazioni scelte ma, nessun risultato è stato statisticamente significativo. Nelle concentrazioni di 0.5 e 15 mg/L, inoltre, il numero di battiti / min è risultato essere incrementato rispetto al controllo (Tabella 13).

Tabella 13. Frequenza cardiaca degli embrioni di *Danio rerio* e *Xenopus laevis* esposti a sei concentrazioni più un gruppo di controllo di SLS.

Gruppi	Frequenza Cardiaca (numero battiti/min)		
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Controllo	224.9 ± 6.3	189.3 ± 6.5	163.7 ± 5.2
0.1 mg/L	143.3 ± 2.2***	127.2 ± 6.0**	151.2 ± 3.7
0.5 mg/L	144.9 ± 2.5***	128.2 ± 2.7**	165.5 ± 3.0
1 mg/L	146.0 ± 2.5*	126.4 ± 2.3**	153.6 ± 3.6
5 mg/L	147.5 ± 1.8**	122.2 ± 3.2***	159.4 ± 3.7
10 mg/L	142.0 ± 1.0***	\	156.2 ± 1.9
15 mg/L	137.5 ± 1.5***	\	167.2 ± 5.6

I dati sono espressi come la media dei valori registrati ± l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del Kruskal-Wallis test seguito dal Dunn's post hoc test. I dati

risultati essere statisticamente significativi rispetto al gruppo di controllo sono evidenziati dall'utilizzo del grassetto e degli asterischi “*” (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Lunghezza media

La lunghezza in tutte e tre le specie testate non ha riportato differenze significative rispetto al gruppo di controllo ($p > 0.05$) e per questo i risultati non sono stati riassunti in tabella.

4.5 Risultati esposizione al Quaternium-15

4.5.1 Invertebrati

Per quanto concerne i test sugli invertebrati, il Quaternium – 15 è stato testato in due differenti concentrazioni (E1: 0.1 mg/L; E2: 1 mg/L) sugli emociti dell'ostrica perlifera (*P. imbricata*) mediante analisi *in vitro* a tre differenti tempi di esposizione (T1: 30 min.; T2: 1h; T3: 24h) mentre, sono stati condotti test *in vivo* su *M. galloprovincialis* per rispettivamente 7 e 14 giorni di esposizione. Anche in questo caso, gli animali sono stati esposti a due differenti concentrazioni (E1: 0.5 mg/L; E2: 1 mg/L). Gli esperimenti condotti hanno dato l'opportunità di pubblicazione di due lavori scientifici (Multisanti et al., 2023; Impellitteri et al., 2024a) di seguito riportati.

Environmental Toxicology and Pharmacology 101 (2023) 104198



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Toxicology and Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/etap



Short-term *in vitro* exposure of *Pinctada imbricata*'s haemocytes to quaternium-15: Exploring physiological and cellular responses

Cristiana Roberta Multisanti^a, Kristian Riolo^a, Federica Impellitteri^b, Imen Chebbi^c, Caterina Faggio^{a,*}, Alessia Giannetto^a

^a Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Ferdinando Stagno D'Alcontres, 31, 98166 Messina, Italy

^b Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Viale Giovanni Palatucci snc, 98168 Messina, Italy

^c Laboratory of Biodiversity and Aquatic Ecosystems, Faculty of Science, University of Sfax, BP, 3038, Tunisia





Evaluating quaternium-15 effects on *Mytilus galloprovincialis*: New insights on physiological and cellular responses

Federica Impellitteri^{a,1}, Kristian Riolo^{b,1}, Cristiana Roberta Multisanti^a, Giorgia Zicarelli^b, Giuseppe Piccione^a, Caterina Faggio^{b,c,*}, Alessia Giannetto^b

^a Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Viale Giovanni Palatucci snc, 98168 Messina, Italy

^b Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy

^c Department of Eco-sustainable Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Naples, Italy

Vitalità cellulare esperimento *in vitro*

Gli emociti dell'ostrica perlifera dopo 30 minuti di esposizione hanno iniziato a mostrare riduzioni significative di vitalità sia nei saggi con il TB che con il NR in entrambe le concentrazioni testate. Come riportato in Tabella 14, infatti, le cellule trattate con il saggio colorimetrico del TB presentavano, in questo lasso di tempo, percentuali di vitalità pari al 94.0% (E1) e al 92.3% (E2) visivamente inferiori rispetto al 98.7% di vitalità delle cellule del gruppo di controllo. Il decremento nella vitalità, reso visibile da questa colorazione, è andato poi ad incrementare in relazione all'aumento del tempo di esposizione, arrivando a un valore minimo del 86.0% di vitalità osservato nelle cellule di ostrica perlifera trattate con E2 dopo 24h di trattamento ($p < 0.01$). Non sono emerse, invece, differenze significative fra i gruppi sperimentali.

Tabella 14. Saggi di vitalità cellulare degli emociti di *Pinctada imbricata* trattate con due concentrazioni di Quaternium-15 (E1: 0.1 mg/L; E2: 1 mg/L) per 30 min., 1h e 24h. I test sono stati condotti mediante l'utilizzo dei saggi colorimetrici Trypan Blu e Rosso Neutro.

Gruppi Sperimentali				
Saggio	Tempo	Controllo	E1 (0.1 mg/L)	E2 (1 mg/L)
Vitalità Emociti				

Trypan Blu	30 min	98.7 ± 0.8 ^a	94.0 ± 1.7 ^b	92.3 ± 4.2 ^b
Rosso Neutro	30 min	98.7 ± 0.8 ^a	94.8 ± 0.8 ^b	91.8 ± 1.0 ^b
Trypan Blu	1h	98.5 ± 0.8 ^a	91.8 ± 1.7 ^b	88.2 ± 4.3 ^b
Rosso Neutro	1h	98.5 ± 0.8 ^a	91.5 ± 2.1^b	87.2 ± 4.6 ^b
Trypan Blu	24h	99.0 ± 0.7 ^a	87.3 ± 3.9 ^b	86.5 ± 3.6 ^b
Rosso Neutro	24h	99.0 ± 0.7 ^a	88.0 ± 4.0 ^b	86.0 ± 2.6 ^b

I risultati sono espressi come la media percentuale delle vitalità ± l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dall'applicazione del Tukey post hoc test. Lettere diverse e grassetto vanno ad evidenziare dati significativi diversi ($p < 0.05$).

Andamento analogo è stato osservato nelle cellule saggiate mediante NR, rispetto al gruppo di controllo, infatti, dopo 30 minuti di esposizione al Quaternium-15 sia la concentrazione E1 che la E2 mostravano differenze significative ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ rispettivamente) passando dal 98.7% di vitalità del gruppo di controllo al 91.8% di vitalità nell'E2. Il medesimo risultato è stato, poi, ottenuto dopo un'ora di esposizione e dopo 24h. Il minimo di vitalità cellulare è stato osservato, anche in questo caso, nelle cellule esposte alla concentrazione più alta di Quaternium-15 che dopo 24h presentavano una media dell'86% delle cellule vitali al fronte di una percentuale del gruppo di controllo pari al 99% ($p < 0.01$). Infine, come nell'analisi condotta mediante TB, tra la prima concentrazione scelta e la seconda non sono state messe in evidenza differenze significative.

Vitalità cellulare esperimento *in vivo*

L'elaborazione dei dati sulla vitalità delle cellule della DG di *M. galloprovincialis* sono stati riassunti nella Tabella 15. I test hanno fatto emergere, dopo sette giorni di esposizione, differenze significative fra gruppo di controllo e la concentrazione maggiore nella colorazione mediante NR ($p < 0.05$). Medesima significatività ($p < 0.05$)

è stata anche ottenuta fra i trattati in quanto le cellule dei mitili trattati mediante E1 presentavano una vitalità paragonabile a quella del controllo.

Tabella 15. Saggi di vitalità cellulare nelle cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* trattate con due concentrazioni di Quaternium-15 (E1: 0.5 mg/L; E2: 1 mg/L) per 7 e 14 giorni. I test sono stati condotti mediante l'utilizzo dei saggi colorimetrici Trypan Blu e Rosso Neutro.

Gruppi Sperimentali				
Saggio	Tempo	Controllo	E1 (0.5 mg/L)	E2 (1 mg/L)
Vitalità Ghiandola Digestiva				
Trypan Blu	7 giorni	98.6 ± 0.4	98.5 ± 0.5	98.1 ± 0.5
Rosso Neutro	7 giorni	98.5 ± 0.6 ^a	98.5 ± 0.5 ^a	96.5 ± 0.6 ^b
Trypan Blu	14 giorni	99.2 ± 0.3 ^a	95.3 ± 1.5 ^b	96.9 ± 0.7 ^a
Rosso Neutro	14 giorni	99.1 ± 0.3 ^a	97.6 ± 0.5 ^a	97.2 ± 0.7 ^b

I risultati sono espressi come la media percentuale delle vitalità ± l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dall'applicazione del Tukey post hoc test. Risultati significativi diversi sono evidenziati da lettere diverse e sono riportati mediante l'utilizzo del grassetto ($p < 0.05$).

Al raggiungimento dei quattordici giorni di esposizione, invece, un decremento significativo della vitalità delle cellule è stato osservato anche nella concentrazione più bassa scelta. Infatti, il saggio del TB ha messo in evidenza come, rispetto alle cellule del gruppo di controllo (vitalità 99.2%), quelle del trattato (E1) hanno presentato una vitalità massima del 95.3% ($p < 0.01$; Tabella 15). Al contrario, mediante test del NR è stato osservato un leggero decremento della vitalità risultato significativo in E2 ($p < 0.05$). Differentemente da ciò che è stato ottenuto ai sette giorni di esposizione, dopo quattordici giorni non sono state registrate differenze significative fra i trattati.

Attività di fagocitosi esperimento *in vitro*

L'attività fagocitaria degli emociti dell'ostrica perlifera ha mostrato un decremento in relazione alla crescita del tempo di esposizione e alla crescita della concentrazione alla

quale sono state incubate le cellule. Come riportato nella Figura 35, infatti, i gruppi dei trattati dopo 30 minuti hanno manifestato un decremento dell'attività fagocitaria che è passata da oltre l'80% nel gruppo di controllo a circa il 30% nelle cellule esposte alla concentrazione di E2 ottenendo risultati significativi ($p < 0.01$). Il decremento nella capacità di effettuare fagocitosi osservato in E2 è risultato, inoltre, significativo rispetto al decremento ottenuto per le cellule esposte ad E1 che dopo 30 minuti presentavano dei tassi fagocitari pari al 78%. Dopo un'ora di esposizione la tendenza di decremento si è mantenuto costante evidenziando una elevata diminuzione dell'attività fagocitaria anche da parte delle cellule trattate con E1 ottenendo così risultati di riduzione significativi rispetto al gruppo di controllo per entrambi i trattati ($p < 0.01$). Anche in questo caso è stata osservata una differenza significativa tra E1 ed E2 ($p < 0.05$).

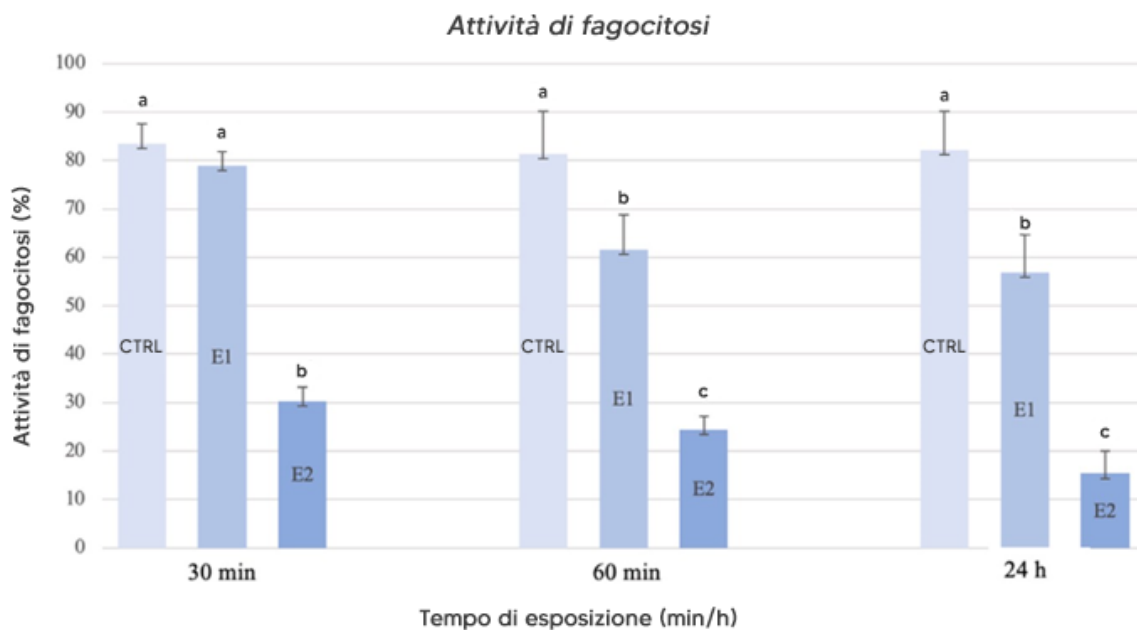


Fig. 35. Istogrammi sull'attività fagocitaria degli emociti di *Pinctada imbricata* esposti a due concentrazioni di Quaternium-15 (E1: 0.1 mg/L; E2: 1 mg/L) in tre tempi differenti (T1: 30 min; T2: 60 min e T3: 24 ore). Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. I dati sono stati espressi mediante percentuale delle cellule che hanno effettuato la fagocitosi. A risultati significativi diversi corrispondono lettere diverse ($p < 0.05$).

Al raggiungimento delle 24 ore di esposizione la diminuzione dell'attività fagocitaria dei tratti si è mantenuta costante rispetto al gruppo di controllo. Anche in questo caso,

infatti, gli emociti dell'ostrica perlifera esposti a E1 e E2 fagocitavano significativamente meno rispetto agli emociti del gruppo di controllo ($p < 0.05$; $p < 0.01$) con percentuali di attività rispettivamente di poco superiori al 55% e al 15% del totale delle cellule osservate. L'attività fagocitaria degli emociti esposti a E2 è risultata essere, in tutti e tre i tempi di esposizione, significativamente più bassa rispetto alle percentuali ottenute per il gruppo esposto ad E1.

Test dell'RVD esperimento *in vivo*

L'abilità dei mitili di regolare il loro volume cellulare una volta esposti a due concentrazioni di Quaternium-15 è risultata essere alterata già dopo solo sette giorni di esposizione. Infatti, come espresso all'interno del grafico della Figura 36, le cellule del gruppo di controllo e quelle del trattato E1 dopo aver raggiunto il massimo rigonfiamento, una volta effettuato il lavaggio con la soluzione ipotonica, (rispettivamente del 16.5% e del 13.0% rispetto al volume iniziale), hanno mantenuto l'abilità paragonabili di regolazione del volume tornando quasi del tutto allo stato originale pre-test non presentando, pertanto, risultati significativi. Al contrario, invece, le cellule trattate mediante E2, alla somministrazione della soluzione ipotonica, hanno registrato un incremento volumetrico nettamente più basso rispetto a quello del gruppo di controllo (9.6%) e non sono state in grado di riottenere il volume iniziale al seguito della conclusione della fase sperimentale mostrando pertanto con le cellule del controllo una differenza significativa ($p < 0.01$). Le cellule della DG trattate con E2 hanno mostrato una tendenza a raggrinzire rispetto al volume iniziale. Non sono emerse differenze significative tra il trattato E1 e il trattato E2 dopo sette giorni di esposizione al Quaternium-15.

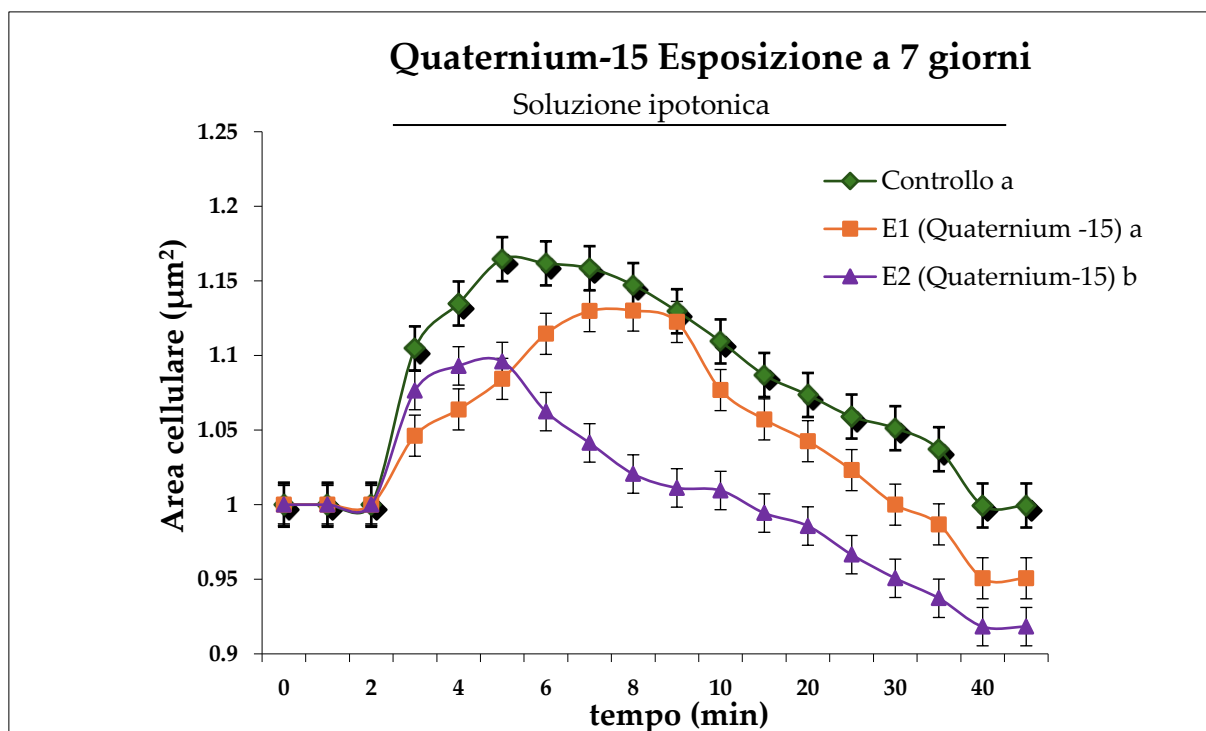


Fig. 36. Regolazione del Volume cellulare di cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* esposte a due concentrazioni di Quaternium-15 (E1: 0.5 mg/L; E2: 1 mg/L) per 7 giorni di esposizione. I dati sono stati espressi come la media dei valori $\pm$ l'errore standard di minimo 15 cellule selezionate. I dati di controllo sono stati evidenziati dalla presenza del simbolo dei rombi "◆", E1 dai quadrati "■" ed E2 dai triangoli "▲". Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. Lettere diverse fanno riferimento a significatività diverse ($p < 0.05$).

Dopo quattordici giorni di esposizione, le cellule dei mitili trattate mediante E1 hanno perso la capacità di regolare il loro volume mostrando un andamento di rigonfiamento alterato lungo tutto il periodo sperimentale. Come visibile nella Figura 37, infatti, si può osservare come, al seguito del raggiungimento di un primo e rapido picco di rigonfiamento ottenuto dopo IPO2 (15.0%), le cellule hanno gradualmente iniziato a sgonfiare per poi raggiungere un secondo picco a IPO8 (10.8%) rimanendo in quest'ultimo caso in uno stato di rigonfiamento e non ritornando al volume iniziale. Nonostante questa alterazione i risultati non sono stati statisticamente significativi rispetto a quelli osservati nel gruppo di controllo. Come per l'esposizione a sette giorni, anche in questo caso il gruppo trattato con la concentrazione più alta di Quaternium-

15 ha fatto registrare risultati significativi di alterazione sia rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$) e sia rispetto al gruppo trattato mediante E1 ($p < 0.01$). Nello specifico le cellule hanno mostrato una percentuale di rigonfiamento rispetto al volume iniziale del 11.6% e, al termine della fase sperimentale, non sono più state in grado di ritornare allo stato iniziale mostrando un generale raggrinzimento.

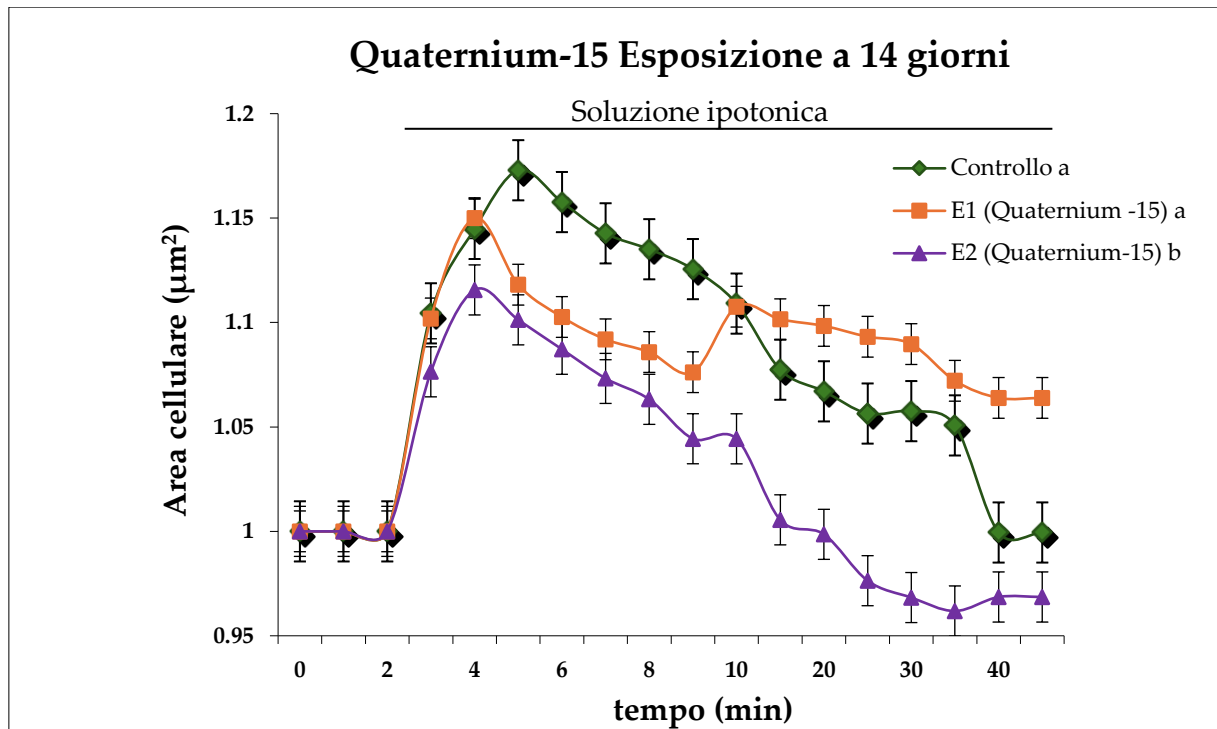
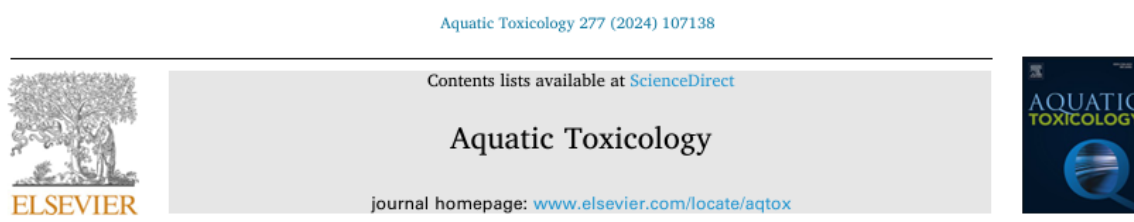


Fig. 37. Regolazione del Volume cellulare di cellule di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* esposte a due concentrazioni di Quaternium-15 (E1: 0.5 m/L; E2: 1 mg/L) per 14 giorni di esposizione. I dati sono stati espressi come la media dei valori $\pm$ l'errore standard di minimo 15 cellule selezionate. I dati di controllo sono stati evidenziati dalla presenza del simbolo dei rombi "◆", E1 dai quadrati "■" ed E2 dai triangoli "▲". Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione dell'ANOVA a una via seguito dal Tukey post hoc test. Lettere diverse evidenziano significatività diverse ($p < 0.05$).

4.5.2 Vertebrati

L'esposizione al Quaternium-15 in specie di vertebrati è stata effettuata in fase preliminare mediante l'utilizzo di cinque concentrazioni su embrioni di carpa comune, al seguito sono stati condotti due ulteriori test su embrioni di danio zebrato ed embrioni di xenopo liscio. Alla luce dei risultati ottenuti sugli embrioni di carpa alle

cinque concentrazioni precedentemente selezionate è stato deciso di aggiungere la concentrazione di 1 mg/L. I risultati in merito agli effetti dell'esposizione di vertebrati al Quaternium-15 sono stati riassunti in maniera dettagliata all'interno dell'articolo scientifico di Zicarelli et al., (2024c) di seguito riportato.



Appraisal of a synthetic preservative, Quaternium – 15, effect on three model organisms: new insight on environmental risks

Giorgia Zicarelli^a, Federica Impellitteri^b, Caterina Faggio^{a,c,*}, Jana Blahova^d,
Barbora Riesova^d, Renata Hesova^d, Pavla Lakdawala^d

^a Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Ferdinando Stagno D'Alcontres 31, 98166 Messina, Italy

^b Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Viale Giovanni Palatucci snc, 98168 Messina, Italy

^c Department of Eco-sustainable Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Naples, Italy

^d Department of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic

Tassi di mortalità

La mortalità degli embrioni di carpa ha fatto registrare il 100% di individui morti dopo sole 48 ore di esposizione nella concentrazione più elevata (25 mg/L $p < 0.001$) e dopo 96 ore di esposizione anche nelle concentrazioni di 15 e 20 mg/L ($p < 0.001$). Un'elevata mortalità fra gli embrioni di carpa è stata anche osservata negli animali trattati con le concentrazioni di 5 e 10 mg/L dove dopo 96 ore di esposizione la percentuale di mortalità ha toccato rispettivamente il 29.2% ($p < 0.05$) e il 79.2% ($p < 0.001$) degli embrioni totali. L'elevata mortalità, e la significatività rispetto al gruppo di controllo, è stata osservata anche negli embrioni di danio zebrato in cui, in tutte le concentrazioni scelte, dopo 96 ore di esposizione i tassi di mortalità sono risultati statisticamente

significativi ($p < 0.001$) con oltre il 40% degli embrioni di pesce zebra morti dopo questo arco di tempo (Tabella 16).

Tabella 16. Tasso di mortalità cumulativa espresso in % degli embrioni di *Cyprinus carpio* e *Danio rerio* esposti a sei concentrazioni di Quaternium-15 più un gruppo di controllo.

Mortalità Comulativa (%)								
Quaternium-15								
Gruppi	<i>Cyprinus carpio</i>				<i>Danio rerio</i>			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	0	0	4.2	0	0	0	0
1 mg/L	\	\	\	\	33.3**	33.3**	33.3**	41.7***
5 mg/L	8.3	8.3	8.33	29.2*	33.3**	33.3**	33.3**	66.7***
10 mg/L	16.7	29.2**	29.2**	79.2***	25.0*	25.0*	54.7***	95.8***
15 mg/L	12.5	66.8***	75***	100***	16.7	16.7	66.7***	87.5***
20 mg/L	8.3	95.8***	95.83	100***	16.7	20.8*	58.3***	87.5***
25 mg/L	4.2	100***	100***	100***	25.0*	50.0***	87.5***	95.8***

I risultati sono espressi come la somma delle mortalità per la singola concentrazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I dati significativi ottenuti rispetto al gruppo di controllo sono stati evidenziati dal grassetto e dalla presenza di asterischi "***" (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Per quanto concerne i tassi di mortalità osservati per gli embrioni di xenopo, dopo 96 ore di esposizione il 100% degli embrioni trattati con le concentrazioni di 15, 20 e 25 mg/L ($p < 0.001$) sono risultati essere morti mentre, gli embrioni trattati con una concentrazione di 5 e di 10 mg/L hanno mostrato risultati leggermente meno significativi rispetto al gruppo di controllo (la cui mortalità è stata pari all'8.3%) con rispettivamente una percentuale di mortalità del 37.5% ($p < 0.05$) e del 50.0% ($p < 0.01$). Tutti i risultati sono riportati in Tabella 17.

Tabella 17. Tasso di mortalità cumulativa espresso in % degli embrioni di *Xenopus laevis* esposti a sei concentrazioni di Quaternium-15 più un gruppo di controllo.

Mortalità Comulativa (%)				
Quaternium-15				
Gruppi	<i>Xenopus laevis</i>			
	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	4.2	4.2	8.33
1 mg/L	12.5	12.5	12.5	20.83
5 mg/L	12.5	12.5	20.8	37.5*

10 mg/L	12.5	12.5	25.0	50.0**
15 mg/L	8.3	8.3	25.0	100***
20 mg/L	20.8*	25.0	66.7***	100***
25 mg/L	12.5	33.33*	100***	100***

I risultati sono espressi come la somma delle mortalità per la singola concentrazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I dati significativi ottenuti rispetto al gruppo di controllo sono stati evidenziati dal grassetto e dalla presenza di asterischi “*” (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Tassi di schiusa

A causa della mortalità del 100% registrata per gli embrioni di carpa nelle concentrazioni di 20 e 25 mg/L non è stato possibile osservare alcuna schiusa degli individui ma, alterazione e ritardo significativo nel tasso di schiusa sono stati osservati per gli esemplari esposti alle concentrazioni di 10 e 15 mg/L dove meno del 20% degli embrioni risultava essere uscito dall'uovo dopo le 96 ore di esposizione ($p < 0.001$). Nessuna differenza significativa è stata invece osservata negli embrioni di carpa trattati con la concentrazione di 5 mg/L di Quaternium-15 rispetto al gruppo di controllo (Figura 38A).

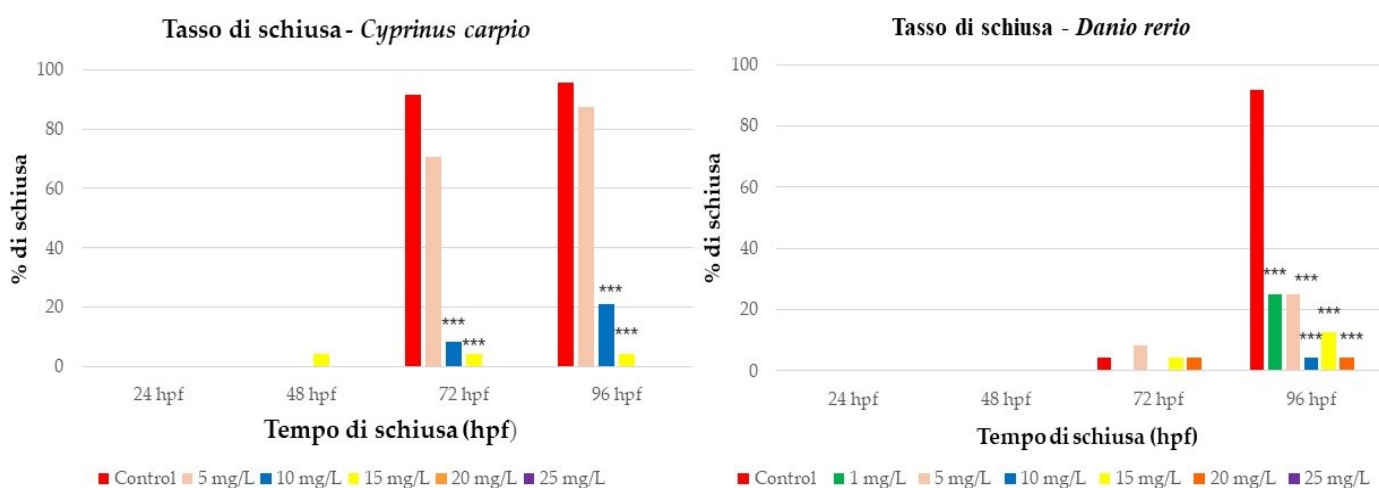


Fig. 38. Istogramma dell'andamento di schiusa degli embrioni di *Cyprinus carpio* (38A) e *Danio rerio* (38B) esposti a differenti concentrazioni di Quaternium-15 per 96 ore di osservazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I risultati sono espressi in percentuale (%) e i dati significativi rispetto al gruppo di controllo sono evidenziati dalla presenza di asterischi “*” posti in corrispondenza della colonna in cui si è registrata la significatività (***) ($p < 0.001$).

Andamento simile alle carpe è quello osservato negli embrioni di danio zebrato in quanto il gruppo di controllo dopo 96 ore mostrava una percentuale di circa il 90% degli embrioni schiusi sul totale mentre quelli esposti alle concentrazioni di 1, 5, 10, 15 e 20 mg/L hanno fatto registrare ritardi significativi nel tasso di schiusa ($p < 0.001$) (Figura 38B). Come per le carpe esposte a 25 mg/L l'elevato tasso di mortalità osservato nel pesce zebra non ha portato all'osservazione di alcuna schiusa negli embrioni esposti a questa concentrazione.

Infine, l'esposizione al Quaternium-15 non ha causato alcuna alterazione negli embrioni di xenopo che già dopo 48 ore di esposizione hanno iniziato a uscire dalla seconda membrana di cui è costituito l'uovo con delle percentuali paragonabili a quelle del gruppo di controllo. Dopo questo arco di tempo, infatti, oltre l'80% degli embrioni aveva raggiunto il trentaquattresimo o trentacinquesimo stadio di sviluppo. Per questa ragione i risultati non sono stati riportati.

Comparsa e valutazione malformazioni

L'incidenza delle malformazioni per gli embrioni di carpa è aumentata al progredire del tempo di esposizione. Malformazioni significative, infatti, hanno iniziato a comparire dopo 48 ore di esposizione nelle concentrazioni di 10 e 15 mg/L ($p < 0.01$ e $p < 0.05$) e dopo 96 ore di esposizione risultati significativi si sono registrati anche nella concentrazione di 5 mg/L (Tabella 18). Le malformazioni principalmente osservabili sugli embrioni di carpa sono state: edema pericardici, ematomi, deformazioni a carico della spina e della pinna. La percentuale maggiore di individui di carpa malformati è stata ottenuta dopo 96 ore di esposizione alla concentrazione di 10 mg/L (54.2%).

Tabella 18. Presenza di malformazioni espresse in percentuale (%) degli embrioni di *Cyprinus carpio* e *Danio rerio* esposti a sei concentrazioni di Quaternium-15 più un gruppo di controllo.

Presenza di malformazioni (%)		
Quaternium-15		
Gruppi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Danio rerio</i>

	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Controllo	0	0	0	0	0	0	0	0
1 mg/L	\	\	\	\	0	4.2	8.3	20.8
5 mg/L	0	0	0	50.0***	0	0	12.5	20.8
10 mg/L	0	25**	33.3**	54.2***	0	8.3	8.3	8.3
15 mg/L	0	20.8*	20.8*	20.8*	0	4.2	4.2	4.2
20 mg/L	0	\	\	\	0	16.7	16.7	16.7
25 mg/L	0	\	\	\	4,17	20.8*	20.8*	20.8*

I risultati sono espressi come la somma delle malformazioni per singola concentrazione. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del test del chi-quadrato (χ^2). I dati significativi ottenuti rispetto al gruppo di controllo sono stati evidenziati dal grassetto e dalla presenza di asterischi "" (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Per quanto concerne i risultati ottenuti negli embrioni di pesci zebra, invece, al seguito dell'influenza dell'elevata mortalità embrionale, le principali malformazioni si sono osservate negli esemplari esposti alla concentrazione di 25 mg/L (20.8% di embrioni malformati) dove sono state ottenute anche le uniche significatività rispetto al gruppo di controllo che non ha riscontrato l'insorgenza di malformazioni durante tutto l'arco sperimentale ($p < 0.05$). Come per le carpe le principali malformazioni sono state la comparsa di ematomi, di edema, malformazioni a carico della spina e della pinna caudale. A 72 ore di esposizione anche gli embrioni esposti a concentrazioni da 1 a 20 mg/L hanno presentato malformazioni per quanto il risultato non è stato significativo (Tabella 18).

Anche per gli embrioni di xenopo l'unica significatività rispetto al gruppo di controllo è stata osservata dopo 48 ore di esposizione negli embrioni trattati con la concentrazione di 25 mg/L e una percentuale di malformati del 29.2% ($p < 0.01$) a confronto con il gruppo di controllo che non mostrava alterazioni. Oltre alle malformazioni già elencate e osservate nei ciprinidi, malformazioni osservate esclusivamente negli embrioni di rana sono state: l'alterazione pigmentaria con un incremento o un decremento della pigmentazione e il mancato sviluppo di organi. Malformazioni, seppur non significative, sono state osservate in tutte le concentrazioni testate da 1 a 25 mg/L dopo le 72 ore di esposizione raggiungendo il massimo nella

concentrazione di 10 mg/L con il 33.3%. Alla luce dell'unica significatività ottenuta i risultati riguardanti l'insorgenza di malformazioni nello xenopo non sono stati riportati in tabella.

Esempi delle malformazioni osservate negli embrioni di carpa, danio zebrato e xenopo sono stati raggruppati in Figura 39.

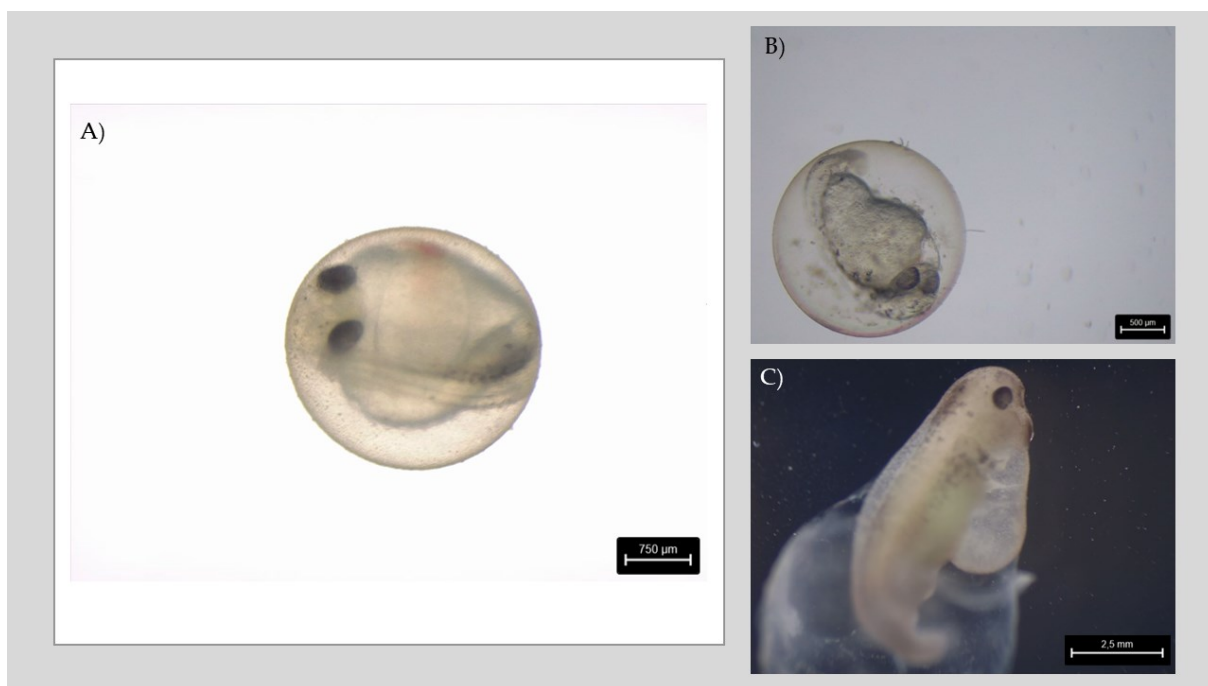


Fig. 39. Esempi di malformazioni in embrioni di *Cyprinus carpio* esposto a una concentrazione di 10 mg/L di Quaternium-15 dopo 48 ore (Fig. 39A), di *Danio rerio* esposto a una concentrazione di 15 mg/L di Quaternium-15 dopo 48h (Fig. 39B) e di *Xenopus laevis* esposto a una concentrazione di 25 mg/L di Quaternium-15 dopo 48h (Fig. 39C). Nella figura sono visibili la presenza di ematoma; edema pericardici; principio di coagulazione (Fig. 39B); embrioni ancora non schiusi; malformazioni a carico dell'intera struttura corporea con curvatura della colonna vertebrale, riduzione della lunghezza totale dell'animale e edema pericardici.

Frequenza cardiaca

L'esposizione alle diverse concentrazioni di Quaternium-15 ha influenzato negativamente la frequenza cardiaca di entrambe le specie di ciprinidi. Infatti, negli embrioni di carpa (Tabella 19) il numero di battiti al minuto è diminuito rispetto al gruppo di controllo negli animali esposti alle concentrazioni di 5, 10 e 15 mg/L ($p < 0.001$; $p < 0.01$ e $p < 0.001$). Per questa specie è stato impossibile riportare i dati in merito

alle concentrazioni più elevate a causa del 100% di mortalità osservato già dopo le prime 48 ore di esperimento.

Tabella 19. Frequenza cardiaca degli embrioni di *Cyprinus carpio* e *Danio rerio* esposti a sei concentrazioni di Quaternium- 15.

Frequenza cardiaca (numero battiti/min)		
Gruppi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Danio rerio</i>
Controllo	224.9 ± 6.3	252.3 ± 7.0
1 mg/L	\	180.7 ± 4.2*
5 mg/L	129.0 ± 2.1***	177.1 ± 2.8*
10 mg/L	137.2 ± 2.5**	157.8 ± 3.5***
15 mg/L	115.9 ± 8.6***	172.5 ± 4.6*
20 mg/L	\	151.2 ± 6.4***
25 mg/L	\	146.3 ± 2.2***

I dati sono espressi come la media dei valori registrati ± l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del Kruskal-Wallis test seguito dal Dunn's post hoc test. I dati risultati essere statisticamente significativi rispetto al gruppo di controllo sono evidenziati dall'utilizzo del grassetto e degli asterischi "***" (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

Anche per gli embrioni di pesce zebra (Tabella 19) è stato osservato un decremento significativo del numero di battiti per minuto in tutte le concentrazioni selezionate, passando dal gruppo di controllo che presentava 252.3 battiti/min a un minimo di 146.3 battiti/min negli embrioni esposti a concentrazione di 25 mg/L (p < 0.001).

Nessun risultato significativo è stato invece registrato e osservato per gli embrioni di xenopo in cui il numero di batti/min era paragonabile al gruppo di controllo e per tale ragione i dati non sono stati riportati.

Lunghezza media

A causa dell'elevata mortalità e del numero di malformazioni osservate è stato impossibile calcolare e misurare i cambiamenti nella lunghezza in tutti i gruppi test delle carpe fatta eccezione per il gruppo di controllo che presentava una lunghezza media di 9.8 mm. Allo stesso modo la lunghezza degli embrioni di danio zebrato è

stata misurabile solo per gli animali esposti alle concentrazioni di 1 e 5 mg/L (6.3 mm; 5.8 mm) che non hanno mostrato però alcuna alterazione significativa rispetto al gruppo di controllo (6.2 mm di lunghezza media). Significatività, invece, è stata osservata negli embrioni di xenopo esposti alle concentrazioni di 5 e 10 mg/L ($p < 0.01$ e $p < 0.001$) rispetto al gruppo di controllo con una riduzione della lunghezza media. Infatti, in questi gruppi la lunghezza media degli individui è stato osservato essere rispettivamente di 11.6 e 10.5 mm al fronte di una lunghezza media degli individui del controllo pari a 13.4 mm. Come per gli embrioni dei ciprinidi non è stato possibile prendere le lunghezze nelle concentrazioni maggiori a causa dell'elevata mortalità ottenuta al seguito dell'esposizione (Tabella 20).

Tabella 20. Lunghezza degli embrioni di *Xenopus laevis* dopo 96 ore di esposizione a sei concentrazioni di Quaternium-15 più il controllo.

Lunghezza media (mm)	
Quaternium-15	
Gruppi	<i>Xenopus laevis</i>
Controllo	13.4 ± 0.3
1 mg/L	13.5 ± 0.2
5 mg/L	11.6 ± 0.2**
10 mg/L	10.4 ± 0.2***
15 mg/L	\
20 mg/L	\
25 mg/L	\

I dati sono espressi come la media dei valori registrati ± l'errore standard. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'applicazione del Kruskal – Wallis test seguito dal Dunn's post hoc test. I dati risultati essere statisticamente significativi rispetto al gruppo di controllo sono evidenziati dall'utilizzo del grassetto e degli asterischi “**” (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

5. Capitolo 5 – Discussione

L'interesse nei riguardi della cosmesi, da sempre presente nel quotidiano umano, è andato crescendo nel tempo passando da rudimentali tecniche messe in pratica dalle prime tribù e società organizzate, al raggiungimento dei moderni prodotti di cura personale. L'ampio utilizzo dei PCPs nei giorni odierni ha portato ad un aumentato interesse, e ad un'incrementata attenzione, da parte delle persone e della comunità scientifica soprattutto nei confronti della formulazione dei PCPs e degli effetti che il loro utilizzo ha sul corpo e sull'ambiente una volta che viene raggiunto (Aliverti, 2023; Persistence Market Research, 2020). A rendere però difficile il controllo della loro circolazione si è visto essere la presenza di articoli a poco prezzo facilmente reperibili in negozi generici, ad esempio i supermercati, verso cui il compratore è maggiormente indirizzato a discapito di negozi specializzati i cui prezzi dei PCPs risultano essere spesso maggiorati (Gran View Research, 2023). A questa problematica si va a sommare l'incapacità da parte degli impianti di depurazione di effettuare una completa e corretta degradazione portando così a un loro accumulo all'interno dei bacini idrici e delle acque marine (Ebele et al., 2017; Khalid et al., 2021).

Quando parliamo di PCPs, pertanto, facciamo riferimento a tutti quei composti di origine sintetica o naturale che, grazie alle loro proprietà antimicrobiche, antiossidanti, conservanti, emulsionanti ecc., entrano a far parte della normale formulazione di tali prodotti. Fra questi agenti chimici, sia di nuova formulazione che no, rientrano il PVA, il BIT, il PEG, l'SLS e il Quaternium-15, le cui informazioni sull'interazione con le comunità acquatiche, una volta immessi e accumulati in natura, sono datate, scarse o del tutto inesistenti (Alonso – López et al., 2021; Asio et al., 2023; Becker et al., 2010; Liu et al., 2018; Nascimento et al., 2021). Per tale ragione e per la loro frequente presenza nei PCPs sono state scelte come sostanze test.

Alla stessa maniera, come illustrato nel dettaglio nei capitoli precedenti, molluschi, Cyprinidae e anuri (in particolare afferenti al genere *Xenopus*), grazie alle loro

caratteristiche di: basso costo di mantenimento, poche cure e poco spazio necessario, gran numero di uova e conseguenzialmente popolazioni numerose, similarità genetiche con il genoma umano e elevata distribuzione mondiale che rende facilmente replicabile un esperimento; sono ottimi organismi modello per la valutazione degli effetti degli xenobiotici sulle comunità non bersaglio (Carotenuto et al., 2020; Curpan et al., 2022; Mikula et al., 2024; Zicarelli et al., 2022).

Discussione PVA

Invertebrati

Per le analisi eco-tossicologiche sugli invertebrati l'impiego di organi bersaglio quali: le cellule emolinfatiche, le cellule della DG e le branchie derivate dai molluschi bivalvi, sono stati comprovati essere buoni modelli per la restituzione di importanti e significativi risultati per la determinazione dei possibili effetti avversi causati dall'esposizione a un composto chimico (Santovito et al., 2021). La maggior parte degli emociti di mitilo sono dotati, infatti, di un sistema vacuolare lisosomiale estremamente sviluppato coinvolto non solo nell'inglobare particelle dall'esterno, funzionando da sistema di difesa per l'organismo ma, grazie alla presenza di una serie di idrolasi, è coinvolto anche nel meccanismo di degradazione delle componenti di organismi esterni come potrebbero essere le pareti delle cellule batteriche (Canesi et al., 2002). Alterazioni di tale apparato, pertanto, sono segnale di un possibile danno o condizioni di stress subentrate nell'organismo al seguito dell'interazione con xenobiotici dagli effetti dannosi (Zhang et al., 2017; Stara et al., 2020). Nel presente lavoro, gli studi di vitalità cellulare, effettuati mediante esposizione a PVA degli emociti di mitilo, hanno evidenziato una interazione negativa fra composto chimico e organismo. In particolar modo, la significatività riscontrata nelle cellule colorate mediante TB nella concentrazione più alta di PVA presa in esame, sottolinea un'iniziale alterazione della stabilità delle pareti lisosomiali. L'instabilità e il danno alle pareti lisosomiali, causato

dall'esposizione alla maggior concentrazione, è stato confermato ed osservato anche nel leggero decremento della vitalità delle cellule di DG dopo quattordici giorni di trattamento. In generale, però, la mortalità ottenuta, seppur si discostava in maniera significativa da quella del controllo, è risultata essere in linea con la poca letteratura presente sull'argomento. Nello specifico, l'esposizione dell'invertebrato *Paracentrotus lividus* (riccio di mare comune) per 48 ore ad una concentrazione di 10 mg/L e l'esposizione a *Daphnia magna* per quattordici giorni alle concentrazioni di 1 µg/L; 0.5 mg/L e 1 mg/L di PVAs hanno restituito una bassa mortalità e immobilità degli individui (Alonso-López et al., 2021; Nigro et al., 2022). La bassa mortalità ottenuta può essere data dalla capacità da parte dei mitili, e di altre specie di bivalvi, di contrastare le condizioni di stress ambientali adattando il proprio organismo e le proprie cellule (Nardi et al., 2017). L'adattamento è possibile grazie all'attivazione di segnali trasduzionali per l'immediata riparazione dei danni causati dalla perturbazione in corso (Yao et al., 2013). Tuttavia, come messo in luce dai decrementi delle vitalità osservati alle più alte concentrazioni, una prolungata esposizione ad alti dosaggi può provocare una perdita della vitalità delle cellule già ottenuta in passato in altri lavori che vedono coinvolti composti presenti nella formulazione di PCPs (Faggio et al., 2016; Porretti et al., 2023).

I test colorimetrici, però, forniscono informazioni solo in merito all'integrità delle membrane cellulari e pertanto informazioni parziali sulla salute e funzionalità delle cellule (Filice et al., 2024b). Sicuramente, per la restituzione di un quadro più dettagliato, è fondamentale la valutazione di altri parametri coinvolti nel funzionamento di una cellula come possono essere l'RVD e la valutazione dello stress ossidativo. Come riportato maggiormente nel dettaglio nei capitoli precedenti (Capitolo 2), le cellule possono rispondere ai cambiamenti osmotici mediante la regolazione del proprio volume, capacità fondamentale per il mantenimento delle funzioni dell'organismo (Tresnakova et al., 2023a). Situazioni ambientali avverse

possono conseguenzialmente compromettere tale funzionalità causando un danno alle cellule. Nel caso dell'esposizione al PVA, la mancata capacità di regolare il volume è stata osservata in maniera opposta nelle due concentrazioni prese in esame. Alla concentrazione più bassa le cellule, alla termine della fase sperimentale, hanno iniziato a mostrare un raggrinzimento rispetto al volume iniziale mentre, nella concentrazione più alta, le cellule sono rimaste in uno stato di rigonfiamento perdendo la capacità di recuperare la forma di partenza dopo la conclusione del tempo totale di osservazione. Il danno mostrato dalle cellule di DG, al seguito dell'interazione con il PVA, può essere stato causato sia a livello delle proteine canale che a livello del citoscheletro. Nonostante le mancate informazioni legate all'esposizione al PVA, un andamento simile a quello ottenuto era stato già in precedenza osservato in studi che vedevano il coinvolgimento di composti rientrati nella categoria dei PCPs (Faggio et al., 2016; Impellitteri et al., 2023b; 2024b; Pagano et al., 2016) che colpivano in maniera negativa il funzionamento delle cellule di DG del mitilo.

Per quanto concerne la condizione di "stress ossidativo", invece, essa subentra nell'organismo nel momento in cui i ROS, prodotti dall'animale in condizioni di normale metabolismo cellulare, iniziano ad essere sovraprodotti al seguito di una perturbazione esterna in grado di modificare l'equilibrio esistente tra ossidanti/antiossidanti a favore degli ossidanti (Regolini & Giuliani, 2014). Per evitare l'alterazione dello stato ossidativo le specie presentano un sistema antiossidante enzimatico e non-enzimatico che aiuta nella prevenzione dei danni causati dalla presenza eccessiva dei ROS (Birben et al., 2012). Nel presente lavoro, l'aumento della produzione di ROS al seguito dell'esposizione al PVA è stato sottolineato dall'incrementata e significativa attività della SOD osservata nell'esposizione alla più alta concentrazione nelle branchie di mitilo rispetto all'attività della SOD osservata nel gruppo di controllo. Le branchie rappresentano il primo punto di contatto tra l'ambiente esterno (l'acqua in cui è disciolto l'inquinante) e l'organismo, per tale

ragione, l'elevata attività della SOD, che agisce da "spazzino" dei ROS, enfatizza la presenza di un'interazione negativa fra mitili e PVA. L'organismo, infatti, mediante l'aumentata attività della SOD e il conseguenziale incremento della capacità pulente cerca di contrastare la presenza di reattivi dell'ossigeno (Messina et al., 2014). Lo stato di stress e la sovrapproduzione questi ultimi, sono stati confermati dai derivati carbonilici i cui livelli osservati nelle fasi sperimentali sono risultati elevati. Questi, sono usati frequentemente come marcatori di stress ossidativo ed un loro aumento è stato osservato in specie marine venute a contatto con inquinanti (Almroth et al., 2008; Dalle Donne et al., 2003; Patetsini et al., 2013). L'introduzione dei gruppi carbonilici nelle proteine può avvenire in differenti modi: ossidazione delle catene laterali degli amminoacidi; scissione ossidativa delle proteine mediante α -amidazione e mediante ossidazione delle catene laterali glutammiliche (formazione di derivati chetonici). In aggiunta, i derivati reattivi carbonilici unitamente agli aldeidi, prodotti durante il processo di LPO, possono causare a loro volta carbonilazione proteica (Møller et al., 2011). OMP e SOD, pertanto, presentano una correlazione positiva. In questo caso un'aumentata attività della SOD non riesce comunque a contrastare l'ingente produzione di ROS causata dall'esposizione al PVA e di conseguenza si osserva l'incremento dei livelli dei derivati chetonici e aldeidici (Filice et al., 2023).

Vertebrati

I risultati e le significatività ottenute negli invertebrati sono stati supportati dalle osservazioni effettuate al seguito dell'esposizione alle due taglie di PVA degli embrioni di pesce zebra e di xenopo. Nello specifico, la bassa mortalità avuta con i test sulla vitalità cellulare di mitilo si è riflessa negli embrioni di pesce zebra in cui per tutte le concentrazioni i valori di mortalità cumulativa non hanno ecceduto il 4.2% in nessuna delle taglie di PVA prese in esame. Mortalità comparabili sono state ottenute anche nel lavoro di Nigro et al., (2022) in cui gli esemplari di danio zebrato trattati mediante PVA a concentrazioni di 1 $\mu\text{g/L}$, 0.5 mg/L e 1 mg/L presentavano in tutte le condizioni una

vitalità superiore all'86%. Al contrario di ciò che è stato descritto in precedenza, il PVA Low, ma ancor più nello specifico il PVA Medium, hanno causato percentuali maggiori e significative di mortalità negli embrioni di xenopo in cui, in alcuni casi, si sono osservati oltre il 20% degli embrioni morti dopo 96 ore di trattamento. Tale risultato, non in linea con quelli visti in letteratura da Nigro et al., (2022) sottolineano una maggiore sensibilità delle rane che possono essere negativamente colpite da una prolungata esposizione agli xenobiotici nei primi stadi del loro sviluppo e anche alle basse concentrazioni di inquinamento (Yu et al., 2013). Tale risultato va così a evidenziare l'importanza del condurre analisi su organismi appartenenti a diversi livelli evolutivi per avere la restituzione di un quadro informativo quanto più vicino possibile alla reale casistica ambientale. Conseguenze negative sono state osservate nel pesce zebra, invece, nei tassi di schiusa degli embrioni. Nello specifico, fatta eccezione per gli individui trattati mediante concentrazione 0.1 mg/L di PVA-Medium che hanno mostrato un ritardo significativo della schiusa, nel PVA-Low alle maggiori concentrazioni si è osservato una maggiore rapidità nella schiusa rispetto al gruppo del controllo che in questi organismi ha iniziato a schiudere intorno le 72 ore dopo la fecondazione come da normale sviluppo embrionale dell'organismo (Kimmel et al., 1995). Il ritardo della schiusa osservato nel PVA-Medium potrebbe essere dovuto all'ipossia causata dall'esposizione alle particelle inquinanti. La sostanza, infatti, può andare ad occludere i pori presenti sul corion del danio zebrato rendendo difficoltosi gli scambi di ossigeno tra l'organismo e l'esterno (Cheng et al., 2007). Alla stessa maniera, la stessa ipossia può aver causato danni a livello mitocondriale andando ad incentivare i movimenti spontanei e la schiusa precoce rispetto al gruppo di controllo osservata negli altri gruppi sperimentali (Carlson & Siefert, 1974). Le uova di rana, invece, sono caratterizzate dalla presenza di una doppia membrana a protezione dell'embrione (Licht, 1985). Probabilmente è questa la ragione per cui i tempi di schiusa degli esemplari di xenopo esposti a PVA non sono stati negativamente colpiti

dall'interazione con l'agente chimico utilizzato. Inoltre, per quanto in letteratura siano pochi gli studi riguardanti cambiamenti di sviluppo negli organismi modello trattati mediante PVAs, risultati analoghi a quelli ottenuti per il pesce zebra sono stati riportati. È stato osservato, infatti, un ritardo nella crescita larvale di plutei di *Paracentrotus lividus* esposti al PVA 0.29 (idrolisi 87.0-89.0 mol) e al PVA 0.30 (idrolisi 99.0-99.4 mol) dopo una esposizione acuta di 48h alla concentrazione di 10 g/L (Alonso-López et al., 2021).

L'insorgenza di malformazioni è un tipo di analisi facilmente osservabile e precedentemente già riscontrata nei test eco-tossicologici condotti su embrioni di svariati organismi modello trattati mediante sostanze chimiche comunemente presenti all'interno delle formulazioni dei PCPs (Quintaneiro et al., 2019; Venâncio et al., 2022). Nel caso specifico del PVA, l'esposizione a differenti taglie ha causato differente insorgenza di malformazioni sia nel pesce zebra che nello xenopo. Pur osservando in entrambe le specie la presenza di edema pericardici, addominali o alla testa, malformazioni a carico della colonna vertebrale, del corpo o un'alterata pigmentazione, l'esposizione al PVA ha messo, ancora una volta, in risalto la maggiore sensibilità degli individui di rana rispetto a quello di pesce zebra. Le percentuali di organismi malformati sono state superiori al 50% rispetto al gruppo di controllo in quasi tutti gli individui di xenopo trattati mediante PVA-Medium. A rendere difficoltosa un'analisi e una comparazione dettagliata sulle malformazioni che hanno colpito i due modelli del presente lavoro è la mancata presenza in letteratura, per nostra conoscenza, di studi che prendono in esame tale parametro. Tuttavia, l'esposizione di embrioni di rana e danio zebrato ai PCPs ha fatto registrare l'insorgenza di malformazioni significative (Falfushynska et al., 2017; Merola et al., 2020a).

Lo studio del cuore di pesce zebra e xenopo e delle alterazioni causate dall'interazione con gli xenobiotici sono fra i parametri di embrio-tossicità maggiormente analizzati in

letteratura (Blahova et al., 2021; Kazi et al., 2024). Per nostra conoscenza questo è il primo lavoro che indaga le conseguenze dell'esposizione a differenti taglie di PVAs sulla frequenza cardiaca di modelli animali acquatici e pertanto, come espresso anche in precedenza per altri parametri, non è stata possibile una completa comparazione. Quello che è emerso dai test condotti, però, è stata una opposta e significativa alterazione tra gli embrioni di danio zebrato e quelli di xenopo al seguito dell'esposizione a PVA-Low. La conta dei battiti avvenuta alle 48h ha infatti evidenziato come gli embrioni di pesce zebra presentavano una frequenza cardiaca incrementata in quasi tutte le concentrazioni mentre alle medesime concentrazioni e taglia di inquinante gli xenopi presentavano frequenze decrementate. Al contrario, i risultati ottenuti negli embrioni esposti a PVA-Medium sono stati simili per entrambi gli organismi modello in quasi tutte le concentrazioni prese in esame in cui la ratio è risultata incrementata. Hanno fatto eccezione gli embrioni di xenopo trattati mediante concentrazioni di 50 e 100 mg/L (PVA-Medium) in cui la ratio è risultata essere significativamente decrementata. L'interazione con i PVAs, invece, non ha messo in evidenza importanti alterazioni sulla lunghezza degli animali che rispetto al gruppo di controllo variavano in quantità minima o del tutto nulla.

In letteratura, infine a completezza del dato, sono stati presi in considerazione ulteriori parametri al seguito dell'esposizione ai PVAs che non sono stati considerati ai fini del presente lavoro. Fra questi è stato preso in esame l'eventuale alterazione del comportamento di organismi modello in presenza di PVAs. Nello specifico, l'esposizione di *D. magna* a una concentrazione di 0.5 mg/L di polvere di PVA ha causato una maggiore prestazione nel nuoto durante 60 minuti di ciclo luce/buio rispetto al gruppo di controllo seppur il risultato non è stato statisticamente significativo (Nigro et al., 2022). Alla stessa maniera, dal medesimo lavoro, gli esemplari di danio zebrato non hanno mostrato, quando in gruppo, un naturale comportamento di congelamento una volta trattati con concentrazioni di 1 µg/L e 0.5

mg/L della stessa polvere di PVAs usata su *D. magna*. Inoltre, dopo 120h di esposizione, nella concentrazione 1 mg/L, le prestazioni di movimento degli individui di pesce zebra hanno mostrato un rapido e importante decremento (Nigro et al., 2022).

Discussione BIT

Invertebrati

L'utilizzo di test *in vitro* rispetto a test *in vivo* sfruttando gli emociti di mitilo è stato dimostrato essere un approccio utile e poco impattante per comprendere quelli che sono gli effetti su specifiche cellule bersaglio in ambiente controllato (Cruz et al., 2023). Tale analisi, inoltre, permette l'impiego di un minor numero di animali prima di procedere a un'esposizione *in vivo* che genera un maggior impatto sulla comunità (Cruz et al., 2023). Per quanto concerne lo studio condotto sul BIT, questo ha messo in luce un'interazione tra la sostanza e cellule di mitili di tipo negativo. Tale fenomeno è stato messo in evidenza dal declino della vitalità emocitaria quando le cellule sono state esposte alle due concentrazioni di BIT. In particolar modo questo si è notato dopo tre ore di trattamento nella concentrazione più alta selezionata in cui l'alterazione della stabilità lisosomiale e gli effetti citotossici sono stati più evidenti (Li et al., 2016). Una interazione negativa fra BIT e cellule era stata già infatti resa nota durante i test preliminari condotti sul porcellino d'India. In questi animali, di fatto, alcuni esemplari mostravano reazioni allergiche cellula-mediate nel test condotto sui linfonodi locali murini (Andersen & Hamann, 1984). I lisosomi sono direttamente impegnati nei meccanismi della seconda linea di difesa contro le condizioni di stress esterno e una loro alterazione porta, pertanto, a una diminuzione della capacità di adattamento e alla morte cellulare (Canesi et al., 2007). Una perdita di vitalità emocitaria, di bivalvi utilizzati per la realizzazione di test *in vitro*, è stata comunemente osservata insorgere al seguito di reazioni negative con l'entrata a contatto delle cellule e del contaminante

che perturbava l'equilibrio fisiologico; un esempio è quello dato dagli emociti di *Dreissena polymorpha* esposti al TSC e al Trimetoprim (Udayan et al., 2023). I risultati ottenuti negli emociti sono strettamente correlati all'osservata alterazione nell'effettuare fagocitosi da parte di queste cellule. La fagocitosi è il principale strumento di difesa messo in atto da tali cellule e coinvolge la fusione dei lisosomi ai fagosomi che vengono sollecitati da differenti segnali (Burgos-Aceves & Faggio, 2017). L'esposizione al BIT è stata vista causare un'importante alterazione proprio di questo meccanismo riflessosi in una riduzione dell'attività fagocitaria fino al raggiungimento di percentuali inferiori al 20% degli emociti totali in grado di fagocitare dopo tre ore di esposizione. Questa osservazione va così a sottolineare ed avvalorare l'impatto negativo che l'esposizione al BIT ha sull'attività cellulare con potenziali effetti degenerativi sui recettori posti sulla superficie delle cellule che non sono più in grado di effettuare fagocitosi. Un andamento simile è stato visibile già in altri studi in cui è stata valutata l'attività fagocitaria sotto condizioni di stress come quelli di Panebianco et al., 2023 e Parisi et al., 2021. Al contrario, i risultati ottenuti nella vitalità cellulare della DG mostrano un rapido adattamento di queste ultime alla perturbazione innescata dalla esposizione al BIT. Il risultato ottenuto, però, non è del tutto inusuale per la ghiandola digestiva di mitilo le cui cellule hanno mostrato una simile capacità di adattamento anche in altri esperimenti *in vivo* che vedevano il coinvolgimento della cozza Mediterranea come organismo modello (Pagano et al., 2022; Tresnakova et al., 2023a; b). La riduzione di vitalità osservata durante lo studio è risultata, inoltre, essere in linea con precedenti lavori che hanno avuto come scopo il testare gli effetti del BIT sul pesce zebra condotti da Li et al., (2016). Nel lavoro in questione, una concentrazione di 0.2 mmol/L di BIT è stata somministrata ad embrioni di danio zebrato che hanno fatto registrare il 100% di mortalità al seguito dell'esposizione (Li et al., 2016). Gli effetti avversi dati dal BIT sulla cozza mediterranea sono stati, poi, ulteriormente sottolineati dai risultati ottenuti sull'analisi effettuata riguardo la capacità di

regolazione volumetrica in risposta a soluzioni osmotiche. Come espresso anche in precedenza, nel loro stato naturale le cellule della DG dei bivalvi sono in grado di compiere rigonfiamenti e raggrinzimenti volumetrici in risposta ai cambi di osmolarità. Questo le rende capaci di ritornare al loro volume d'origine quando esposte a soluzioni iper o ipotoniche (Hoffman et al., 2009) ma, in condizioni di stress, questa abilità tende ad esser persa costringendo la cellula a permanere in uno stato di alterazione continuo. È stato proprio il secondo scenario quello presentatosi nelle cellule di DG esposte a BIT2 che mostravano una evidente incapacità di rigonfiare e ritornare al volume iniziale sia dopo una che dopo tre ore di esposizione. I risultati ottenuti possono, allora, essere connessi a possibili danni a livello delle proteine canale o del citoscheletro al seguito dell'interazione tra le cellule e il BIT che è stato precedentemente provato causare inattivazione e denaturazione proteica (Collier et al., 1990). Inoltre, risultati analoghi sono stati documentati in altri test *in vivo*, i cui risultati sono stati illustrati nel seguente lavoro (es. Quaternium-15), che hanno visto l'impiego della cozza mediterranea come organismo modello e conservanti presenti nei PCPs come il BIT in cui la capacità di effettuare RVD è risultata essere alterata (Faggio et al., 2016; Impellitteri et al., 2024a; Pagano et al., 2016).

Discussione PEG

Invertebrati

Come illustrato in precedenza, condurre analisi cito-tossicologiche sulle branchie, la DG e l'emolinfa di mitilo permette di ottenere importanti e veritieri risultati sull'interazione tra un composto chimico e le cellule di specie non bersaglio che vengono influenzate dalla presenza in ambiente di tale sostanza. Da questo punto di vista, quel che è emerso dai risultati sui test condotti sui mitili esposti al PEG è la forte interazione tra questo xenobiotico, gli emociti e gli epatociti. In entrambi i casi si è di fatto osservato un decremento della vitalità cellulare significativo in particolar modo quando esposti alla concentrazione maggiore presa in considerazione. Come precedentemente espresso in merito alle discussioni effettuate su altri composti, queste popolazioni cellulari svolgono un ruolo chiave nei processi fisiologici dei mitili fra cui: risposta immunitaria, metabolismo e detossificazione (Auguste et al., 2020; Cruz et al., 2023). Il NR è un colorante che permette di evidenziare i lisosomi all'interno delle cellule e le loro stabilità. Nel caso specifico del PEG, i risultati significativi suggeriscono come le membrane lisosomiali, fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare e per la risposta ai fattori esterni di stress siano state compromesse dopo quattordici giorni di trattamento apparendo all'osservazione al microscopio alterate e lise con il colorante che si presentava diffuso all'interno della cellula (Porretti et al., 2023; Tresnakova et al., 2023b). I mitili, grazie proprio alla capacità di regolazione dell'attività lisosomiale sono in grado di mostrarsi resilienti agli ambienti contaminati e ostili. Sono i lisosomi, infatti, che mediante l'attività autofagica difendono l'organismo degradando e riciclando le componenti cellulari per mitigare gli impatti degli xenobiotici e dei patogeni (Tresnakova et al., 2023a; 2023b) ed è per questo che l'alterazione di questa capacità risulta essere ottimo indicatore di citotossicità (Osuoha et al., 2023). A supporto dei risultati ottenuti mediante NR va evidenziato come in condizioni di salute delle membrane cellulari esse non permettono

al TB di penetrare all'interno della cellula colorandola di blu cosa che, al contrario, è accaduta alle cellule degli individui esposti alle concentrazioni maggiori di PEG. La perdita di vitalità cellulare ottenuta dalle analisi condotte sui mitili è stata in linea con i pochi dati presenti in letteratura e presentati da Hatami et al., (2019) in cui si è osservato un simile danneggiamento nelle membrane cellulari della carpa comune (*C. carpio*) esposte alla medesima concentrazione utilizzata nel presente lavoro e pari a 10 mg/L. Un'ulteriore conferma del danno cellulare avvenuto negli esemplari di mitilo, al seguito dell'esposizione al PEG, è stato ottenuto mediante il test dell'RVD in cui le cellule della DG hanno perso la loro capacità di regolare il volume. Tale caratteristica è stata ampiamente studiata nel corso del tempo e descritta nelle sezioni precedenti risultando ormai noto come una prolungata esposizione a xenobiotici, come sono i PCPs, possa portare a un danneggiamento (Panebianco et al., 2023; Wehner et al., 2003). La mancata capacità di regolare il proprio volume da parte delle cellule una volta esposta a PEG è risultata essere in linea con i risultati ottenuti con l'esposizione al Quaternium – 15 o all'SLS (Capitolo 4) sottolineando così come i composti chimici impiegati per la formulazione dei PCPs possono portare a un danno negli organismi non-bersaglio (Impellitteri et al., 2024a; b). La mancata capacità di regolare il volume rappresenta un segnale, inoltre, di danni a livello delle proteine canale del citoscheletro che vanno così ad alterare le funzioni fisiologiche delle cellule e delle sue membrane (Barmo et al., 2013; Hoffman et al., 2009). Alla stessa maniera, l'esposizione a possibili inquinanti come il PEG causa nell'organismo un'alterazione nell'omeostasi ossidativa e un conseguenziale incremento nella produzione delle specie reattive dell'ossigeno. I ROS a loro volta possono facilmente interagire con le macromolecole come DNA, proteine o lipidi causandone un'alterazione sia funzionale che strutturale provocando un danno alla forma fisica degli animali (Filice et al., 2023; Sies et al., 2017). Per questo effettuare analisi su determinati marcatori rappresenta un buono strumento per determinare la gravità degli effetti che determinati composti hanno sulle specie. La

modulazione dei biomarcatori ossidativi dipendenti dai PCPs è stata riportata in diverse specie acquatiche, tra cui il pesce rosso, *Carassius auratus*, e la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Liu et al. 2015; Silva et al., 2018). I dati in merito agli effetti che il PEG ha sullo stato ossidativo degli animali acquatici sono scarsi. Le principali informazioni reperibili fanno riferimento a un'esposizione di ventuno giorni avvenuta alle concentrazioni di 5 e 10 mg/L sulla carpa comune (Hatami et al., 2019). Tale esposizione non influenzava in alcun modo l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) nel plasma e neanche l'attività della CAT o la perossidazione lipidica nel fegato (Hatami et al., 2019). In maniera simile lo stato ossidativo della DG e delle branchie di mitilo non sembra essere influenzato negativamente dall'esposizione al PEG fatta eccezione per il leggero incremento della LPO nelle branchie. Al contrario, l'esposizione alla concentrazione minore di PEG ha influenzato negativamente l'attività della SOD nelle branchie e aumentato la LPO in entrambi i tessuti. Ovviamente, sono dati preliminari che richiedono l'impiego di altri enzimi antiossidanti per permettere una completa descrizione dello stato ossidativo dei mitili quando esposti al PEG. Tuttavia, le informazioni ottenute grazie alla SOD e alla LPO suggeriscono come anche una bassa concentrazione di tale composto possa inibire il sistema di difesa antiossidante dell'organismo limitando così la capacità di eliminare i ROS come risultato del danno ossidativo sui lipidi. La risposta tessuto-specifica osservata non sorprende in quanto, nei molluschi, le branchie sono il primo tessuto ad entrare a contatto con l'acqua contaminata. Pur non potendo fornire una spiegazione conclusiva in merito all'assenza di effetti osservati nell'attività della SOD alla più alta concentrazione scelta di PEG, è possibile sospettare l'attivazione di altri meccanismi di protezione contro i ROS che permettono di preservare l'equilibrio della redox. Infatti, comportamento simile a quello ottenuto è stato osservato in un altro composto tipicamente presente all'interno dei PCP quale l'SLS in cui nel lavoro di Freitas et al., (2020) si fa presente come

un'alterazione dell'attività antiossidante degli enzimi è visibile solo nella più bassa concentrazione testata.

Vertebrati

L'interazione visibile tra le cellule di mitilo e le molecole di PEG quando si parla di pesci non risulta essere così immediata. Di fatto, come emerso dai test di embriotossicità su danio zebrato, la mortalità dopo anche 96 ore di esposizione è apparsa essere particolarmente bassa (4.2%). Tale dato si è visto essere in linea con precedenti studi in cui è stato coinvolto il pesce zebra e altri ciprinidi. Nel lavoro di Maes et al., (2012), in cui individui di danio zebrato sono stati trattati con diverse concentrazioni di PEG-400, la mortalità è stata sempre superiore all'86% del totale degli individui. Invece, nel lavoro di Hatami et al., (2019) il trattamento di esemplari di carpa comune mediante PEG-400, come precedentemente riportato in relazione alla vitalità cellulare del mitilo, non ha permesso di osservare alcuna mortalità. Risultati simili, inoltre, sono stati osservati anche in invertebrati *Daphnia magna* e *Dugesia japonica* che sono stati rispettivamente trattati con PEG alle concentrazioni di 0.1 e 1 g/L e di 10 mg/L per 96 ore (Li et al., 2012; Sönmez et al., 2020). Al contrario, i dati osservati per gli esemplari di xenopo fanno emergere come vi sia una maggiore interazioni nelle loro prime fasi embrionali con i PEGs mostrando una elevata sensibilità alla presenza in ambiente di tali composti con conseguenze negative al seguito di esposizioni prolungate. Per quanto concerne gli embrioni di pesce zebra, al contrario di quel che è stato visto per i tassi di mortalità, la sperimentazione ha fatto emergere una significativa alterazione nelle percentuali di schiusa degli esemplari trattati quando messi a confronto con i tassi di schiusa del gruppo di controllo. Infatti, quasi in tutte le concentrazioni è stato visibile osservare una maggiore rapidità nelle percentuali di schiusa. Questo fenomeno può essere stato causato dall'ipossia che può aver portato a un danno mitocondriale oppure all'aumento dei movimenti spontanei degli embrioni esposti alle differenti taglie di PEGs come già capitato per l'esposizione al PVA. Sia l'ipossia che l'aumento

di movimenti spontanei, con un conseguenziale incremento nella rapidità di schiusa, sono stati, inoltre, precedentemente evidenziati in lavori che vedevano il coinvolgimento di animali d'acqua dolce come, ad esempio, nei lavori di Carlson & Siefert (1974), Blahova et al., (2021) e Sehonova et al., (2017). Anche in questo caso i risultati ottenuti per lo xenopo sono stati opposti a quelli osservati nel danio zebrato, infatti, la loro schiusa non è stata alterata in alcun modo dalla presenza dello xenobiotico con risultati simili fra trattati e gruppo di controllo. Tuttavia, fare un ulteriore e più specifica comparazione tra i dati ottenuti da questo studio e la letteratura è complicato in quanto sono pochi i lavori che valutano gli stessi test al seguito di esposizioni ai PEGs. Nonostante ciò, nel lavoro di Maes et al., (2012) non sono stati riportati cambiamenti nel normale sviluppo de pesci zebra esposti a PEG-400 fin quando la concentrazione non ha raggiunto il 2.5%.

La comparsa di malformazioni negli embrioni è una osservazione basica e importante per la valutazione degli effetti tossici causati da composti presenti nella formulazione di PCPs (Li et al., 2023; Merola et al., 2020b). L'esposizione alle diverse taglie di PEGs ha causato, infatti, differenti malformazioni in entrambi i vertebrati scelti come organismi modello. In generale le più comuni sono state quelle già riscontrate anche per l'esposizione al PVA ovvero: presenza di edema (cardiaci, cranici e addominali), riduzione o incremento della pigmentazione, malformazioni a carico della colonna vertebrale e della pinna caudale. I risultati hanno fatto emergere, inoltre, come taglie differenti del medesimo inquinante interagiscono e colpiscono in maniera differente gli organismi. Specificatamente, se il PEG-Low non ha causato alcuna malformazione negli individui di pesce zebra, queste sono state osservate nello xenopo anche a basse concentrazioni. Al contrario, l'elevato numero di malformazioni osservate negli embrioni di danio zebrato trattati mediante PEG-High non è stato riflesso nello xenopo in cui è stato osservato e registrato un solo risultato significativo alla concentrazione di 5 mg/L a confronto del gruppo di controllo. Risultati simili a quelli ottenuti sono

stati osservati nella *Daphnia magna* esposta a PEG-600 dopo 24h ore e dopo 48h negli esemplari trattati con PEG-200 e PEG-6000 (Sönmez et al., 2020). Nascimento et al., (2021) ha inoltre riportato una riduzione dei neuromasti, che compongono la linea laterale dei vertebrati, sulla superficie corporea di un'altra specie di rana (*Physalaemus cuvieri*) quando esposta ai PEGs (PEG- Medium (8000) alle concentrazioni di 5 e 10 mg/L).

La valutazione della variazione di frequenza cardiaca dipende generalmente da molti parametri, tra cui rientrano: l'età dell'organismo modello, il sesso e la specie. Come nei casi precedenti anche le informazioni in merito a cambiamenti nella frequenza cardiaca sono scarsi o del tutto inesistenti quando specie non bersaglio vengono esposte a PEG ma, loro importanti cambiamenti sono stati osservabili in precedenza in altri lavori in cui vengono coinvolti PCPs come i filtri UV e i parabeni rendendo evidente come questo sia un importante e utile endpoint per la determinazione di criticità (Merola et al., 2020b; Gayathri et al., 2023). I risultati osservati vanno così a sottolineare come in tutte le taglie testate vi siano significative variazioni nel numero di battiti / min sia negli embrioni di pesce zebra che in quelli di xenopo. Tuttavia, nella comparazione delle due specie salta all'occhio come i risultati registrati risultino essere opposti fra di loro andando così a sottolineare, ciò che è stato reso noto anche nei paragrafi precedenti ovvero, come la medesima sostanza possa portare a differenti risultati in base agli organismi presi in considerazione e alla taglia testata. Ad esempio, i pesci zebra esposti al PEG-Low mostravano un incremento del tasso cardiaco mentre nella stessa taglia gli embrioni di xenopo presentavano un decremento. Alla stessa maniera, l'esposizione al PEG-Medium e PEG-High ha mostrato un decremento nella frequenza cardiaca degli embrioni di danio zebrato e un incremento in quelli di xenopo.

Nei lavori scientifici, infine, altri endpoint sono stati presi in considerazione per la valutazione della tossicità dei PEGs fra cui lo stress ossidativo e cambiamenti nel comportamento; analisi comuni per la valutazione di un danno tossicologico.

Alterazioni dei parametri biochimici sono stati osservati nella carpa comune trattata mediante PEG-400 a una concentrazione di 10 mg/L. Il PEGs, infatti, potendo agire come tensioattivo può avere un ruolo attivo nella distruzione delle membrane cellulari accelerando così la perossidazione lipidica (Hatami et al., 2019). L'incrementa produzione di ROS e di H₂O₂, non compensato dall'aumento di attività della CAT è stato osservato da Nascimento et al., (2021) nella *P. cuvieri*. Infine, cambiamenti nel comportamento esplorativo sono stati osservati da Audria et al., (2020) quando embrioni di pesce zebra sono stati esposti al PEG-400.

Discussione SLS

Invertebrati

In passato, esperimenti che prendevano in esame gli effetti che l'esposizione a SLS causava nei mitili erano già stati effettuati (Freitas et al., 2020; 2021; 2023) e basandoci anche su quei risultati possiamo affermare che l'osservata riduzione nella vitalità emolinfatica delle cellule esposte all'SLS, evidenziata in particolar modo nella colorazione TB, può essere considerata sia come l'inizio dello stress cellulare ma, allo stesso tempo, anche l'inizio della risposta immunitaria ottenendo dei dati in linea con le ipotesi avanzate in letteratura secondo cui l'esposizione a tensioattivi può compromettere il funzionamento delle cellule immunitarie degli organismi acquatici (Asio et al., 2023; Paciello et al., 2023). A supportare i risultati significativi ottenuti ed osservati mediante TB negli emociti, la grande sensibilità all'SLS come inquinante è stata resa nota dalla significativa riduzione della vitalità delle cellule della DG degli organismi esposti. Il saggio di ritenzione del NR, che attesta l'abilità delle cellule vitali di assumere colorante in base alla loro attività metabolica (Martinez-Haro et al., 2016), ha messo in mostra come le cellule della DG sono particolarmente colpite dall'esposizione all'SLS enfatizzando così il ruolo cruciale che occupano nei processi di detossificazione (Porretti et al., 2023). La percentuale di vitalità delle cellule

emolinfatiche e di DG ottenuta nel mix, leggermente più alta di quella osservata nelle cellule del gruppo di controllo, suggerisce, inoltre, una potenziale azione protettiva data dall'estratto di bucce di bergamotto quando usato in combinazione con SLS. Il risultato si va così ad allineare con quelli presenti in letteratura in merito alla capacità dei composti naturali di mitigare gli effetti avversi degli inquinanti ambientali (Karempudi et al., 2024; Omid et al., 2024; Sopjani et al., 2024).

Uno dei processi che mantiene l'efficienza della risposta immunitaria, sotto condizioni di stress imposte dalla presenza di inquinanti ambientali, è l'attività fagocitaria. Effettuata dagli emociti, tramite la sua applicazione, essi sono in grado di mettere in atto meccanismi di detossificazione (Burgos-Aceves et al., 2017). Va tenuto però presente che, per quanto concerne l'emolinfa di mitilo, negli studi di immuno-tossicità essa viene considerata quasi sempre come costituita da un unico tipo cellulare ma, che in realtà, esistono tre sottopopolazioni di emociti: eosinofili (granulati e con elevate capacità fagocitarie), basofili e ialinociti (a-granulati e privi di capacità fagocitaria) che possono essere diversamente rappresentanti all'interno dell'emolinfa e diversamente impattati dalla presenza dell'inquinante portando così all'osservazione di una maggiore o minore capacità fagocitica da parte delle cellule (Rocha et al., 2014). Nel nostro specifico caso i risultati dell'attività fagocitaria sono la prova dell'effetto negativo dell'SLS che, interagendo con l'organismo, va a compromettere la risposta immunitaria innata degli organismi marini incrementando potenzialmente la loro vulnerabilità alle infezioni e alle malattie. L'elevata significatività tra il gruppo di controllo e quello esposto all'SLS vanno, inoltre, a sottolineare ancor di più gli effetti dannosi dei tensioattivi sintetici sulle funzioni cellulari critiche per la difesa immunitaria con una sempre minor presenza all'interno dell'emolinfa di granulociti atti a effettuare fagocitosi. Risultati analoghi sono stati osservati nel presente lavoro al seguito dell'esposizione delle cellule emolinfatiche al Quaternium-15. Anche in questo caso, infatti, l'attività fagocitica ha mostrato importanti decrementi al seguito

dell'esposizione all'inquinante utilizzato andando a colpire la salute e la resistenza degli organismi marini (Multisanti et al., 2023). Questi effetti possono essere attribuiti alla distruzione della membrana cellulare e all'alterazione dei percorsi metabolici causati dall'interazione con l'SLS. Al contrario, l'esposizione al BRG ha mostrato un risanamento della capacità fagocitaria con percentuali di cellule che mostravano tassi di fagocitosi comparabili alle percentuali ottenute per il gruppo di controllo (91.3%). La mancanza di differenze significative tra il gruppo trattato con BRG e quello di controllo, suggerisce che l'estratto di buccia di bergamotto mantenga inalterate le funzioni immunitarie supportando così il ruolo degli estratti naturali nell'aumentare la resistenza delle cellule contro stress ambientali. Come per le analisi di vitalità cellulare, ancora una volta, le scoperte emerse dall'esposizione al BRG si allineano ai risultati già presenti in letteratura in merito agli effetti immunomodulatori che hanno i composti derivati da piante. Tali dati suggeriscono come il bergamotto possa essere utilizzato con successo all'interno dei PCPs come agente protettivo contro i composti di derivazione sintetica presenti nelle loro formulazioni (Banaee et al., 2023; Karempudi et al., 2024). Inoltre, il gruppo trattato con il Mix ha mostrato un'attività fagocitaria del 74.3% indicando come la combinazione del BRG e del SLS mitiga in qualche maniera gli effetti negativi causati dall'SLS, ma allo stesso tempo, la dose utilizzata di BRG è troppo bassa per poter completamente riparare il danno causato e far tornare l'attività fagocitaria ai medesimi livelli osservati nel gruppo di controllo. Pertanto, una maggiore concentrazione di BRG potrebbe essere necessaria per contrastare gli effetti dannosi dell'SLS portando al completo recupero degli animali. Infine, Il test dell'RVD non ha portato a risultati significativi ma, in ogni caso, l'andamento osservato ha fornito delle importanti informazioni sul comportamento osmotico delle cellule di DG nel mitilo sotto differenti condizioni. La capacità di regolare il volume cellulare in condizioni fisiologiche è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi. L'incapacità delle cellule esposte all'SLS di ritornare

alla loro forma iniziale, in unione con la ridotta capacità di gonfiare oltre che nel gruppo trattato mediante SLS che quello del Mix, suggeriscono una importante alterazione di questo meccanismo. L'SLS, in linea con ciò che è emerso dai precedenti test, può causare pertanto la compromissione dell'integrità delle membrane cellulari colpendo così la capacità delle cellule di far fronte ai cambiamenti osmotici (Impellitteri et al., 2024b). Al contrario, la minor riduzione volumetrica osservata nel Mix, rispetto al gruppo trattato solo mediante SLS, conferma ed è di supporto all'ipotesi iniziale del ruolo protettivo che l'estratto di bergamotto può avere contro i danni causati da prodotti sintetici frequentemente inseriti nei PCPs. Ancora una volta, però, la concentrazione selezionata non è stata sufficiente alla completa ripresa delle funzionalità della cellula a prova che ulteriori test in merito necessitano di essere condotti.

Vertebrati

Se in letteratura troviamo informazioni aggiornate sugli effetti che l'esposizione all'SLS può causare negli invertebrati non-bersaglio, non si può dire lo stesso in merito alle informazioni sui vertebrati. Di fatti, come riportato anche nel lavoro redatto da Asio et al., (2023), la maggior parte delle informazioni presenti in letteratura sono antecedenti al 2010, ma lo sversamento e il ritrovamento in natura dell'SLS avviene ancora oggi e pertanto è risultato essere fondamentale, per una completezza di informazioni, andare ad indagarne gli effetti su differenti modelli organismo mediante l'utilizzo di test di embrio-tossicologia comprovati essere buoni test per l'attestazione di un potenziale danno dato da potenziali inquinanti (Aliko et al., 2024; Bachour et al., 2020).

La mortalità, fra i parametri presi in esame, è sicuramente la più facile da attestare in tutti e tre gli organismi modello. Nel caso del presente lavoro le prime mortalità si sono osservate alle concentrazioni di 0.1 mg/L un valore nettamente inferiore rispetto a quello presente nei fiumi britannici e turchi rilevato nel lavoro di Yilmaz & Içgen, (2014). I risultati ottenuti indicano che il pesce zebra e lo xenopo sono maggiormente

sensibili rispetto alla carpa, con gli embrioni di danio zebrato trattati con le più alte concentrazioni morti già dopo 24 ore dalla fecondazione e quasi la metà delle rane che hanno fatto registrare il medesimo dato. L'elevata fragilità degli embrioni di rana agli stress ambientali e a quelli causati da perturbazioni esterne di laboratorio, come può essere il trasporto, è sottolineata dalla presenza di una piccola percentuale di organismi morti anche nel gruppo di controllo. Infatti, dopo 96 ore di sperimentazione si è osservata una mortalità inferiore al 10% nel gruppo di controllo corrispondente a 4 embrioni morti sul totale (48). Questa situazione è stata riportata precedentemente in altri lavori in cui è stato impiegato lo xenopo ed è stato confermato come, mortalità inferiori al 10% nel controllo, non vanno ad infierire sui risultati osservati nei gruppi sperimentali in cui è presente l'inquinante (Dahms-Vester et al., 2023; Yu et al., 2013). I risultati ottenuti sono inoltre coerenti con quelli riportati in letteratura per gli organismi acquatici che vedono un LC_{50} compreso tra 1 e 13.9 mg/L (Ahmadniaye et al., 2023; Bondi et al., 2015). Brunelli et al., (2008) ha attestato LC_{50} tra 4.9 e 5.54 mg/L in analisi condotte sulla donzella pavonina (*Thalassoma pavo*) mentre, Ali et al., (2011) ha riscontrato un LC_{50} di 3.6 mg/L in pesci zebra esposti all'SLS dopo 120 hpf. Meşeli et al., (2021) ha riportato, inoltre, un'elevata mortalità negli embrioni di danio zebrato esposti a una concentrazione di SLS pari a 4 mg/L. Allo stesso tempo Wang et al., (2015) non ha ottenuto i medesimi risultati ma ha reso note basse percentuali di mortalità negli embrioni di pesce zebra (tassi sotto il 10%), dopo 8.5 ore di esposizione e dopo 10 ore di esposizione (concentrazioni di 0.1, 0.2, 0.5 e 1 mg/L). L'elevata sensibilità del danio zebrato può essere attribuita a differenti potenziali meccanismi in quanto è stato provato che gli embrioni e le larve sono particolarmente vulnerabili durante le prime fasi di sviluppo. La rapida divisione cellulare e differenziazione li rendono molto più suscettibili a danni causati da sostanze tossiche, come l'SLS, portando così a una potenziale morte (Hill et al., 2005). Spiegazione di quest'elevata mortalità può essere, inoltre, legata al potenziale stress ossidativo indotto dall'SLS. Lo stress ossidativo,

infatti, può portare a un danno cellulare e al conseguenziale incremento della mortalità. Gli embrioni e le larve potrebbero avere un sistema antiossidante di difesa meno sviluppato rispetto all'adulto aumentando la vulnerabilità ai danni ossidativi (Lushchak, 2011). Risultati paragonabili a quelli riportati da Wang et al., (2015) sono quelli ottenuti per la carpa comune in cui, in tutte le concentrazioni testate, la percentuale di mortalità si è attestata sotto il 10%. Infatti, la mortalità cumulativa alla fine della fase sperimentale è stata di, al massimo, quattro embrioni di carpa morti rispetto al totale degli embrioni che erano stati esposti all'SLS, pertanto, un risultato del tutto influente rispetto a quelli visti per il pesce zebra e per lo xenopo. Tuttavia, per nostra conoscenza, non sono stati condotti altri studi che vedevano utilizzata la carpa comune come organismo modello che fosse esposta ad SLS e, per questo, una analisi e un confronto con i risultati presentati risulta essere difficoltosa.

Per quanto concerne il parametro del tasso di schiusa, esso non ha mostrato alterazione alcuna nelle carpe comuni probabilmente a causa di una maggior resistenza all'inquinante rispetto al danio zebra e alle rane. Al contrario, la velocità di schiusa è stata influenzata negativamente negli embrioni di pesce zebra alla concentrazione di 5 mg/L. I potenziali meccanismi che spiegano il ritardo riscontrato sono riconducibili alla permeabilità della membrana dell'uovo ai contaminanti ambientali che possono penetrare e influenzare negativamente lo sviluppo embrionale (Selman et al., 1993); oppure alterare l'espressione genica come nel caso dei geni *cd63* e *tbx16* che sono coinvolti nella sintesi degli enzimi per la schiusa (Trikić et al., 2011; Wells et al., 2011). Al contrario, le rane hanno mostrato grande sensibilità anche a basse concentrazioni e un decremento significativo della velocità di schiusa è stato registrato negli embrioni di xenopo trattati mediante concentrazioni di 10 e 15 mg/L. Il ritardo può essere stato causato dalla perdita dello strato gelatinoso dell'uovo che ha così facilitato l'assorbimento dell'SLS. In passato, infatti, è stato provato che lo strato gelatinoso che ricopre le uova di rana ha permesso il minor accumulo di DDT rispetto alle uova che

avevano perso tale strato e che, conseguenzialmente, avevano mostrato un ritardo nella schiusa (Licht, 1985). La fase di schiusa delle rane è iniziata intorno alle 48 ore dopo la fecondazione dell'uovo nello stesso momento in cui è stato osservato il primo ritardo significativo. Precedenti studi hanno messo in risalto un ritardo nella schiusa e nello sviluppo di embrioni di pesce zebra che erano stati esposti per 48h a concentrazioni di 750 mg/L di paste dentifrice contenenti SLS (Karaman et al., 2024). Alla stessa maniera Meşeli et al., (2021) ha evidenziato alterazioni nello sviluppo degli embrioni di danio zebrato esposti alla concentrazione di 4 mg/L di SLS e, ancor prima, Wang et al., (2015) aveva osservato cambiamenti nel normale tempo di sviluppo delle uova e degli embrioni di pesce zebra esposti a concentrazioni relativamente basse di SLS (pari a 0.2 µg/L).

Rispetto ai ciprinidi le rane si sono rivelate essere la specie più sensibile all'esposizione a possibili inquinanti (Ismail et al., 2019; Klos et al., 2024). Tale sensibilità è stata ampiamente osservabile nella comparsa di malformazioni. Oltre il 70% delle rane trattate con una concentrazione di 5 mg/L di SLS, infatti, al termine della fase sperimentale presentavano malformazioni. Anche alle concentrazioni inferiori le rane mostravano sul loro corpo segni di: edema, malformazioni del corpo e modifiche nella pigmentazione fra tutte. Inoltre, come riportato per i parametri precedenti, anche in questo caso gli embrioni di danio zebrato e rana rispetto a quelli di carpa comune, presentavano una insorgenza di malformazioni in concentrazioni di esposizione paragonabili a quelle ambientali (Yilmaz & Içgen, 2014). Il presente, però, non è l'unico studio che mette in luce la comparsa di malformazioni su esemplari di pesce zebra al seguito di un'esposizione ad SLS. Per esempio, comparsa di edema sul sacco del tuorlo sono stati riportati dopo 72 ore di trattamento in embrioni di pesce zebra che erano stati esposti a concentrazioni di 4 mg/L e a 1 mg/L (Karaman et al., 2024; Meşeli et al., 2021). Sempre Meşeli et al., (2021) riporta come gli animali esposti alla concentrazione di 4 mg/L presentavano alterazioni a carico della spina dorsale che

assumeva curvature anomale rispetto al gruppo di controllo. Malformazioni non significative sono state osservate anche da Wang et al., (2015) in particolar modo sulla taglia degli occhi, della testa e sulla lunghezza del corpo dei pesci zebra (esposti dalle 28 ore dopo la fecondazione alle 120 ore di vita). Infine, Brunelli et al., (2008) riporta la comparsa di malformazioni in esemplari di donzella pavonina al seguito dell'esposizione all'SLS. Tale organismi, presentavano dopo 96 ore di trattamento, con una concentrazione 3.5 mg/L, una fusione delle lamelle branchiali. In particolar modo nella loro parte distale lungo il loro margine. È stata, inoltre, riportata una sovrapproduzione di muco con la completa assenza del pavimento cellulare fino alla completa perdita della normale organizzazione dell'epitelio branchiale da parte della donzella pavonina al raggiungimento delle 192 ore di esposizione (Brunelli et al., 2008).

Per nostra conoscenza, non vi sono altri studi che prendono in esame i cambiamenti di frequenza cardiaca al seguito di una esposizione all'SLS. Nonostante ciò, in generale, i risultati osservati per i ciprinidi suggeriscono che entrambi gli animali sono negativamente colpiti dall'interazione fra l'embrione e la sostanza, infatti, il numero di battiti per minuto è risultato essere decrementato rispetto al gruppo di controllo. Ancora una volta, i meccanismi che possono aver causato questo significativo rallentamento della frequenza potrebbero ricadere nella condizione di stress ossidativo che ha portato alla sovrapproduzione di ROS. L'insorgenza di uno stato ossidativo può, per l'appunto, danneggiare il tessuto cardiaco e interferire così con le normali funzioni dei cardiomiociti alterando così la frequenza cardiaca (Lushchak, 2011). Un'altra ragione per l'osservazione di questo dato può, inoltre, essere ricercata nella frequenza ventricolare media che diminuisce al seguito dell'esposizione ai possibili inquinanti come osservato da Antkiewicz et al., (2005). Al contrario rispetto ai parametri di mortalità, schiusa e malformazioni, invece, le rane non hanno fatto registrare alterazioni significative nei tassi di frequenza cardiaca. Le riduzioni sono

state minime fatta eccezione per le concentrazioni di 5 e 15 mg/L in cui le rane presentavano un battito accelerato. Tuttavia, la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) esposta a un altro tensioattivo, come l'SLS, anch'esso usato nella composizione dei PCPs, l'alchil benzene sulfonato (LAS), alle concentrazioni di 0.5 mg/L per 96h ha mostrato un decremento paragonabile a quello visto nelle due concentrazioni sopra menzionate della frequenza cardiaca rispetto al gruppo di controllo (Jones-Costa et al., 2018). Invece, l'esposizione al tensioattivo non-ionico: alcool poliossietilene etere-7 (AEO-7), classificato come eco-friendly, si è visto causare un incremento nella frequenza cardiaca degli embrioni di pesce zebra esposti per 96 ore a concentrazioni di 3.2 µg/L (Al-Asmakh et al., 2020) a prova del fatto che i tensioattivi causano disfunzioni cardiache negli animali acquatici.

Infine, a completezza del quadro di analisi sugli invertebrati e i vertebrati esposti a differenti concentrazioni di SLS, e a quelli che sono gli effetti negativi che l'entrare a contatto con tale sostanza causa negli organismi non bersaglio, in letteratura sono stati presi in esame altri parametri di tossicità principalmente biochimici e comportamentali che confermano, e sostengono, i risultati registrati nelle analisi condotte per il presente lavoro. L'esposizione del mitilo mediterraneo all'SLS ha di fatto incrementato la produzione di ROS all'interno dell'organismo facendolo subentrare in una condizione di stress ossidativo evidenziata nell'incrementata attività della SOD, nel mantello e nella DG, dalla stimolazione dell'attività della CAT e dall'incremento dei livelli di Hsp70 negli animali trattati a confronto dei livelli rilevati per il gruppo di controllo (Freitas et al., 2020; 2021; 2023; Messina et al., 2014). Per quanto concerne i vertebrati, invece, sempre nel lavoro di Meşeli et al., (2021) è stato sottolineato come l'esposizione a 1 mg/L e 4 mg/L di SLS negli embrioni di pesce zebra ha significativamente incrementato i livelli di MDA come prodotti finali della LPO. Incremento osservato anche da Bhattacharaya et al., (2022) a tutti i tempi di esposizione. Nella carpa comune, l'esposizione all'SLS (0.34 mg/L e 1.02 mg/L per 45 giorni) ha causato un incremento

nell'attività della CAT dopo che le analisi sono state condotte a 15, 30 e 45 giorni al seguito dell'attivazione dell'effetto neutralizzante verso l'elevata produzione di ROS. Al giorno 15 e 30 di osservazione, inoltre, è stato osservato un incremento nell'attività della GPx e un suo decremento dopo 45 giorni; probabilmente a proteggere le cellule dagli antiossidanti che sono entrati in gioco (Al-Asmakh et al., 2020). Sempre nei vertebrati, sono stati riscontrati cambiamenti nell'espressione genica. Nello specifico, dal lavoro di Wang et al., (2015) è emerso come l'espressione del genere *ntl* (no tail) ha dato luogo a una riduzione del mesoderma assiale e cordale e del suo margine dopo dieci ore di trattamento. Similmente, l'espressione del gene *krox20* è stata più bassa rispetto a quella del controllo nell'80% degli embrioni di pesce zebra trattati con 1 mg/L. Infine, discorso contrastante lo abbiamo per il comportamento che, se nel lavoro di Wang et al., (2015) non risulta essere alterato, in quello di Karaman et al., (2024) il pesce zebra, al contrario, presentava alternazioni nell'attività locomotoria con riduzione della velocità, della distanza percorsa e del tasso di esplorazione. Inoltre, è stata visibile una alterazione dell'espressione genica legata allo sviluppo dei denti (inibito) al seguito dell'esposizione ad SLS (Karaman et al., 2024).

Discussione Quaternium-15

Invertebrati

Il sistema immunitario dei molluschi bivalvi è ormai chiaro essere il primo meccanismo di difesa contro patogeni e xenobiotici (Pagano et al., 2023). Sotto tale ottica, gli emociti sono responsabili delle risposte agli stress andando ad implementare, quando necessario, i meccanismi antiossidanti per la degradazione dei ROS. Pertanto, come esplicitato nelle pagine precedenti, sono considerati buoni marcatori biologici per il monitoraggio degli effetti di possibili contaminanti (Burgo-Aceves et al., 2021; Nogueira et al., 2017). Mediante il lavoro *in vitro* con l'esposizione di emociti dell'ostrica perlifera (*P. imbricata*) per la prima volta si è andata a valutare

la risposta degli emociti di questa specie a condizioni di stress. L'utilizzo delle colorazioni di NR e di TB, già utilizzate con risultati significativi e validi nelle sperimentazioni con il mitilo, sono state scelte proprio per la capacità di penetrare mediante diffusione passiva all'interno delle membrane lisosomiali o di rimanere, come nel caso della colorazione di TB, all'esterno delle membrane quando le cellule si trovano in condizioni di benessere fisiologico (Canesi et al., 2007). Come per l'esposizione al BIT, i risultati ottenuti dal trattamento con il Quaternium-15 hanno messo in evidenza un decremento dose e tempo dipendenti sottolineando così la citotossicità del contaminante. Analisi effettuate *in vivo* su *M. galloprovincialis* confermano la possibilità di una risposta tempo e dose dipendente di riduzione della vitalità e danno citotossico nei molluschi bivalvi (Faggio et al., 2016; Marks et al., 1998), ma anche la loro capacità di adattamento alle perturbazioni. Gli effetti avversi osservati sugli emociti dell'ostrica perlifera sono stati, infatti, confermati dai test effettuati sulle cellule di DG su esemplari di cozza del Mediterraneo. La DG, come osservato nel dettaglio nelle pagine precedenti, è un ottimo bersaglio di studio per determinare gli effetti negativi delle sostanze sull'organismo. Tale importanza è, infatti, favorita dalla capacità di accumulare, all'interno di questo piccolo organo, elevate concentrazioni di una possibile sostanza inquinante (Canesi et al., 2007). Nei molluschi bivalvi, ed in particolare nei mitili, la DG, inoltre, ricopre un ruolo chiave nella degradazione dei nutrienti favorendo così il sostentamento dell'organismo ma, allo stesso tempo, è di cruciale importanza per il processo di detossificazione dell'animale (Pagano et al., 2022). Analizzando pertanto la vitalità delle cellule della DG si possono ricavare importanti informazioni in merito allo stato di salute dell'esemplare studiato. Entrando nello specifico, nei test effettuati mediante esposizione a Quaternium-15, è emersa una interazione negativa fra le cellule di DG e la sostanza, dato sottolineato dall'instabilità delle membrane lisosomiali. Come già ampiamente espresso, infatti, sono i lisosomi a rappresentare la seconda linea di difesa dell'organismo attraverso la

loro capacità autofagica (Tresnakova et al., 2023b). Al seguito dell'esposizione a 14 giorni, poi, il test di ritenzione del NR ha messo in risalto come la vitalità cellulare della DG è rimasta inalterata alla più bassa concentrazione di Quaternium-15 suggerendo la possibilità di un adattamento degli individui alle condizioni di stress a cui sono stati sottoposti. Questo risultato è presumibilmente correlato all'abilità che hanno i molluschi bivalvi di adattarsi alle condizioni ecosistemiche avverse cosa che li rende organismi fortemente resistenti (Lassoued et al., 2019; Nardi et al., 2017). I risultati ottenuti attraverso i test di vitalità cellulare si sono poi riflessi sia nei test *in vitro* che in quelli *in vivo* che hanno visto coinvolte le analisi sull'attività fagocitica e la regolazione del volume cellulare portate avanti rispettivamente sulle cellule emolinfatiche di ostrica perlifera e sulle cellule di ghiandola digestiva di mitilo. I lisosomi proteggono l'individuo inglobando possibili patogeni all'interno delle loro membrane (Pagano et al., 2023). Il tutto avviene mediante recettori di superficie impegnati nell'assorbimento fagocitario e tramite l'attivazione di processi che riorganizzano l'actina del citoscheletro così da ristabilire l'equilibrio (Mateo et al., 2010; May & Machesky, 2001; Panara et al., 1996). L'esposizione al Quaternium-15 ha causato una alterazione di questo naturale processo condotto dagli emociti di ostrica perlifera in cui è stata visibile la riduzione nell'abilità di effettuare fagocitosi; in particolar modo dopo ventiquattro ore di esposizione alla concentrazione maggiore selezionata. Il danno in questione è stato, infine, sottolineato e confermato dall'inabilità delle cellule di DG di *M. galloprovincialis* di tornare al loro volume originale dopo il trattamento mediante soluzione ipotonica. La reazione riscontrata può essere stata causata da un ampio spettro di danni come: malfunzionamenti a livello del citoscheletro e distruzione delle funzionalità delle proteine canale oltre che un ulteriore danno alle membrane cellulari. La regolazione del volume cellulare riveste una posizione di primaria importanza per le cellule in quanto intrinsecamente correlata alla conservazione della funzionalità d'organo cosa che si riflette in una connessione tra la

capacità di regolare il proprio volume e la fisiologia o la fisiopatologia dell'organismo (Pagano et al., 2016). Come ormai chiaro la condizione naturale di queste cellule è data dalla capacità, al seguito di una esposizione a soluzione ipotonica, di gonfiare e, una volta raggiunto il picco, tornare alla forma iniziale; processo dinamico che rende possibile il mantenimento di un equilibrio funzionale al seguito dei cambiamenti delle condizioni ambientali (Impellitteri et al., 2023). Nel lavoro in questione sul mitilo, dopo sette giorni di esposizione è stata visibile una significativa compromissione di tale funzione nel gruppo trattato mediante la concentrazione maggiore. Di fatto, le cellule degli individui esposti hanno fatto registrare una diminuzione della reattività, al seguito dei lavaggi mediante soluzione ipotonica, permettendo di avanzare l'ipotesi che il Quaternium-15 agisca come fattore inibitore sulle componenti cellulari coinvolte nella regolazione osmotica. In più con l'esposizione ai quattordici giorni, è stato reso esplicito un ulteriore fenomeno: le cellule appartenenti al gruppo esposto alla concentrazione minore mostravano l'incapacità di ritornare al volume di partenza. Infatti, sebbene le cellule di E1 mantengano la capacità di gonfiarsi, allo stesso tempo non sono in grado di recuperare completamente lo stato che avevano prima dell'esposizione alla soluzione ipotonica. Questi cambiamenti suggeriscono il coinvolgimento delle componenti vitali delle cellule, inclusi elementi citoscheletrici, come anche il sistema di trasporto di sodio e calcio, che assumono ruoli cruciali per la regolazione del volume nelle cellule (Silva & Wright, 1994; Torre et al., 2013). La principale dimostrazione dell'incapacità di ritornare alle condizioni iniziali è stata osservabile nel gruppo a concentrazione minore mentre, per le cellule trattate mediante concentrazione maggiore è stata visibile una significativa differenza. Tali cellule, infatti, mostrando una maggiore capacità di riduzione volumetrica rispetto allo stato iniziale supportano l'idea che il Quaternium-15 causi citotossicità negli invertebrati.

Vertebrati

Per quanto concerne i test sui vertebrati, invece, per nostra conoscenza quelli effettuati nel presente studio sulla carpa comune, sul danio zebrato e sullo xenopo rappresentano fra i primi lavori a prendere in esame gli endpoint di embrio-tossicità su vertebrati acquatici esposti a Quaternium-15, cosa che ha reso complicato effettuare delle adeguate comparazioni fra i risultati ottenuti e quelli presenti in letteratura e, pertanto, queste sono state principalmente effettuate mediante i risultati presenti che coinvolgevano analisi sugli invertebrati (Faggio et al., 2016; Pagano et al., 2016; Multisanti et al., 2023; Impellitteri et al., 2024) e analisi di citotossicità effettuate su eritrociti di cavallo e vacca (Arrigo et al., 2023).

I risultati ottenuti sull'analisi della mortalità hanno dimostrato come il Quaternium-15 ha un effetto dannoso sulle specie acquatiche anche alle basse concentrazioni. In generale, i pesci hanno mostrato una maggiore incidenza di morti al confronto con gli esemplari di xenopo dopo 96 ore di esposizione alla medesima concentrazione di 1 e 5 mg/L ma, nelle più alte concentrazioni selezionate, i risultati ottenuti sono stati quasi del tutto identici con quasi tutti gli organismi presi in esame morti dopo 96h di esposizione. Una riduzione simile della vitalità è stata quella osservata negli studi di Faggio et al., (2016) in cui le cellule di DG del mitilo esibivano una riduzione della vitalità del 70% dopo diciotto giorni di esposizione alla concentrazione di 1 mg/L di Quaternium-15. Risultati questi, ottenuti anche nell'esposizione *in vitro* sulle cellule emolinfatiche di ostrica perlifera o su quelle di mitilo trattate con Quaternium-15 per sette e quattordici giorni come discusso in precedenza. In entrambi i casi, le cellule emolinfatiche e di DG hanno mostrato un significativo decremento della vitalità. In maniera similare ai risultati visti con i test sui vertebrati, mortalità fetale è stata riportata nei topi da laboratorio esposti a differenti concentrazioni di composti a base di QACs, categoria in cui rientra il Quaternium-15 (Hrubec et al., 2017).

Anche il ritardo nella schiusa osservato negli embrioni dei ciprinidi può essere attribuito all'azione della sostanza sugli animali perché, come successo anche nei casi dell'esposizione a PVA e a PEG, il Quaternium-15 può penetrare all'interno del corion causando oltre che un'elevata mortalità anche il ritardo nello sviluppo embrionale anche solo dopo 24 ore di esposizione. Al contrario, la presenza di un uovo caratterizzato da una doppia membrana per gli xenopi, li protegge dall'azione dello xenobiotico salvaguardandoli dall'alterazione dello sviluppo giustificando la non osservazione di alcun impatto negativo rispetto al gruppo di controllo nella schiusa (Licht, 1985). Alterazioni dello sviluppo non sono insolite quando gli organismi non-bersaglio entrano in contatto con QACs. Infatti, nello studio di Herron et al., (2019), è stato visibile come i topi da laboratorio hanno manifestato un ritardo nello sviluppo al seguito di una esposizione a disinfettanti QACs che possono attraversare la barriera emato-placentale e quella emato-cerebrale embrionale. Tali composti possono inoltre alterare l'emostasi di steroli e lipidi avendo così effetti controversi sull'organismo. In un altro studio, infatti, la crescita dell'alga *Microcystis aeruginosa* è stata inibita dopo 96 ore di esposizione all'QACs (cloruro di benzoalconio) in concentrazioni da 1 a 10 mg/L (Qian et al., 2020).

A sottolineare l'interazione negativa del Quaternium-15 con le specie è stata l'insorgenza di malformazioni in tutti e tre i modelli organismi vertebrati scelti. Come avvenuto per i precedenti test, una comparazione appropriata è risultata essere difficoltosa a causa delle poche informazioni presenti in letteratura. Tuttavia, basandoci sui lavori attualmente pubblicati che vedono come oggetto lo studio sugli invertebrati, dopo diciotto giorni di esposizione Pagano et al., (2016) ha osservato un accumulo massimo di melanina nell'epitelio branchiale delle branchie di mitilo accompagnato dall'assenza delle ciglia frontali e laterali e dall'espansione del vessillo centrale all'interno dei filamenti che sono stati riempiti dalla presenza di emociti (gli animali sono stati esposti a concentrazioni 1 e di 2 mg/L). In più hanno osservato una

sovraproduzione di muco dai granuli posti all'apice delle cellule di Golbet rispetto a quella che è la normale produzione osservata nel gruppo di controllo. Anche Hrubec et al., (2017) ha osservato, nei suoi esperimenti con i topi, la comparsa di anomalie placentali negli organismi trattati mediante QACs con una maggiore incidenza di difetti ai tubi neuronali sottolineando effetti negativi di questa categoria di sostanze.

Alla luce delle alterazioni osservate nella frequenza cardiaca e della bradicardia riscontrata nei pesci, l'effettuare confronti significativi è risultato difficoltoso in quanto la letteratura è sprovvista di analisi sul tasso cardiaco in animali esposti a QACs. Tuttavia, una riduzione della frequenza cardiaca era già stata osservata in precedenza in pesci zebra trattati mediante vari composti presenti comunemente all'interno della formulazione dei PCPs. Un esempio è quello del muschio xilene, una fragranza prodotta sinteticamente utilizzata per dare aroma ai prodotti (Carlsson & Norrgren, 2004), oppure, come osservato anche nel presente lavoro, al seguito dell'esposizione del danio zebrato ai due polimeri solubili PVA e PEG (Zicarelli et al., 2024a).

Infine, riguardo agli effetti sulla lunghezza del corpo, la diminuzione della lunghezza degli esemplari di xenopo esposti a Quaternium-15 può essere dovuta proprio all'interazione tra gli embrioni e la sostanza chimica avvenuta dopo la schiusa che ha causato il ritardo nello sviluppo. Infatti, nonostante la mancanza di informazioni riguardanti la lunghezza delle rane ai QACs, analoghi risultati sono stati visti in esemplari di *X. leavis* trattati mediante composti contenuti nei PCPs come il metilparabene. Nello studio di San Segundo et al., (2013) la lunghezza media degli animali è passata da 10.2 ± 0.4 mm negli individui del gruppo di controllo a 3.5 ± 0.6 mm in quelli testati mediante le più alte concentrazioni. Una riduzione simile è stata, inoltre, osservata in altre categorie come quella dei pesticidi andando così a sottolineare come la crescita embrionale può essere inibita proprio dall'interazione negativa data dai potenziali inquinanti (Babalola et al., 2020).

Nonostante la scarsità di informazione sui parametri sopra menzionati, in letteratura sono state effettuate ulteriori analisi per determinare gli effetti negativi del Quaternium-15 sulle specie non-bersaglio espressi qui di seguito per fornire un quadro completo e dettagliato del perché la presenza in ambiente di tale composto sia dannosa per le comunità. Infatti, nel lavoro *in vitro* effettuato da Arrigo et al., (2023) è emerso come concentrazioni di 0.1 e 1 mg/L di Quaternium-15 causano una riduzione dei valori dei globuli rossi e dei globuli bianchi di cavallo e vacca che si vanno a sommare a un decremento dell'ematocrito, dell'emoglobina e una riduzione del volume corpuscolare quando questo è comparato al volume del gruppo di controllo. Alla stessa maniera sono state effettuate le analisi sull'espressione genica di *P. imbricata* le quali hanno fatto emergere ulteriori effetti negativi. In particolar modo, a confronto del gruppo di controllo sono state osservate alterazioni nell'espressione genica della CAT, nella SOD, nell'actina e nel GPx in tutti i gruppi test presi in esame (Multisanti et al., 2023). Alterazioni simili nei geni associati allo stress ossidativo fra cui le Heat Shock Protein-70 e il citocromo P450 sono stati, infine, osservati anche nel mitilo quando esposto a Quaternium-15 (Impellitteri et al., 2024a).

Rilevanza dei risultati

La scarsità di informazioni, in merito alla tematica dei PCPs, è stata il punto di partenza per la realizzazione del presente lavoro. La sua forza risiede nell'aver presentato, per la prima volta, cospicui dati in merito agli effetti che cinque comuni composti chimici, rinvenibili nei prodotti per la cura della persona, hanno sulle comunità acquatiche non bersaglio quando esse vi entrano in contatto. Prendendo in esame concentrazioni vicine al range di quelle ambientali abbiamo dimostrato, come nel caso di PVA e PEG, che una breve esposizione può comportare alterazioni fisiologiche e morfologiche importanti e differenti nei vari gruppi studio. Le mancate stime in merito alle concentrazioni ambientali e ai danni causati agli ecosistemi sono state, inoltre, rese

evidente dalla difficoltà di effettuare una corretta ed approfondita comparazione dei risultati ottenuti dal presente studio con quelli presentati da lavori simili. Per la prima volta, per nostra conoscenza, sono stati condotti test sui polimeri idrosolubili PVA e PEG in una specie presente all'interno della dieta umana quale *M. galloprovincialis* e sullo xenopo. Inoltre, come nel caso del Quaternium-15 e dell'SLS, l'utilizzo della carpa comune – principale fonte di pesce per i paesi dell'entroterra europeo – e sullo xenopo (specie che condivide gran parte del corredo genetico con l'essere umano) hanno rappresentato fra i primi studi in materia. A questi si sono poi aggiunti i dati raccolti dallo studio dell'emolinfa dell'ostrica perliera *P. imbricata* individuata come nuovo e valido organismo modello. Pioneristica è stata, altresì, la scelta di utilizzare organismi appartenenti a livelli evolutivi e trofici differenti ponendoli a confronto diretto. Mediante le analisi effettuate in ambito citotossicologico ed embriotossicologico, è stato infatti possibile osservare come la medesima sostanza, anche alle basse concentrazioni ambientali, portasse a differenti reazioni ed alterazioni (più o meno gravi) sia nella fisiologia che nella morfologia degli animali presi in considerazione. Tale risultato ha così permesso la restituzione di un quadro completo di quelle che sono le dinamiche, le reazioni, e soprattutto i diversi sistemi di difesa, che le specie non bersaglio mettono in atto per la loro salvaguardia quando permangono in ambienti perturbati.

Infine, l'utilizzo dell'estratto di buccia di bergamotto come possibile nutraceutico a contrasto degli effetti dannosi causati dall'SLS rappresenta, a nostra conoscenza, il primo studio in cui si propone l'inserimento di questo nutraceutico naturale all'interno della formulazione dei PCPs con risultati positivi che dovranno, però, essere approfonditi mediante studi futuri donando così un valore aggiunto allo sforzo di ricerca effettuato nel corso di questi tre anni.

Capitolo 6 - Conclusioni

In conclusione, è ormai chiaro come i PCPs sono entrati a far parte del nostro quotidiano con un utilizzo di tipo giornaliero che coinvolge ogni classe di età senza alcuna distinzione di sesso. Negli ultimi anni, inoltre, una sempre maggiore attenzione è stata posta alla formulazione di tali prodotti con la ricerca di composizioni sempre più “verdi” e a basso impatto per l’uomo e per l’ambiente. Nonostante l’elevato interesse che questi prodotti ricevono, anche e soprattutto dal mondo scientifico, la vastità di sostanze di origine sintetica utilizzate per la loro realizzazione è talmente elevata, soggetta a rapide sostituzioni e correzioni della formula, che le conoscenze che abbiamo in materia risultano essere esigue. In particolar modo, quel che è risultato essere poco noto nella letteratura, sono gli effetti di tali composti sull’ambiente che in alcuni contesti sono del tutto sconosciuti. In quest’ottica, l’ambiente acquatico è sicuramente più sensibile rispetto all’ambiente terrestre con danni a scapito delle comunità che vi vivono molto più evidenti e importanti. L’alta percentuale di rinvenimento in natura di PCPs è dovuta ad impianti di depurazione delle acque reflue inadeguati a sostenere il grande sversamento e all’immissione diretta, come nel caso delle creme solari, che rendono pertanto difficoltoso un controllo negli ecosistemi.

Il presente lavoro ha voluto incrementare le conoscenze in merito a un così centrale argomento tramite la selezione di cinque composti ampiamente utilizzati nella formulazione dei PCPs, verificandone gli effetti su differenti modelli animali acquatici, sia essi di acqua dolce che salata, così da restituire un quadro quanto più completo e vasto possibile in merito ai loro effetti sulle specie non bersaglio una volta raggiunto l’ecosistema. Inoltre, si è voluto provare a proporre sostanze alternative, di derivazione naturale, che aggiunte alla formulazione dei PCPs potessero andare a mitigarne gli effetti.

In sintesi, gli esperimenti condotti hanno messo in luce come gli xenobiotici una volta raggiunto l’ecosistema interagiscano in maniera differente fra le varie specie e come

queste ultime rispondano in maniera unica ai diversi stimoli antropici a cui vengono sottoposte.

Di fatto, le risposte ottenute dagli organismi modello esposti a PVA, BIT, PEG, SLS e Quaternium-15 hanno evidenziato come una specie può essere più o meno sensibile a un composto chimico rendendo esplicita la necessità di una corretta gestione dei PCPs per salvaguardare le comunità acquatiche. Proponendo degli esempi emersi dal presente studio, gli effetti avversi causati dall'esposizione al PVA, hanno fatto registrare interazioni negative molto più importanti nei mitili e negli anfibi rispetto a quelle osservate nei pesci zebra, sottolineando così una maggiore sensibilità di questi organismi. Allo stesso tempo, un'esposizione al Quaternium – 15 risultata dannosa per la risposta fisiologica dei bivalvi e dei ciprinidi che manifestavano importanti ritardi nella schiusa e nelle variazioni di frequenza cardiaca alle basse concentrazioni (più vicine a quelle presenti in ambiente), non ha fatto osservare elevate variazioni nella rana. Così come, l'esposizione all'SLS ha fatto emergere, in aggiunta alla comprovata sensibilità dei bivalvi, anche una risposta negativa di pesci zebra e rane con elevate mortalità, ritardi nella schiusa e malformazioni; al contrario della carpa comune che, se apparentemente sembra non essere stata colpita dalla presenza dell'SLS in acqua al fronte di bassi tassi di mortalità e malformazioni, in realtà, presentava alterazioni della frequenza cardiaca importanti a suggerire la possibile presenza di un danno fisiologico.

Importante, inoltre, è sottolineare come l'aggiunta della buccia di bergamotto in soluzione con l'SLS ha fatto osservare dei risultati positivi con le cellule di mitilo che manifestavano un parziale recupero delle funzionalità fisiologiche alterate dalla presenza dell'inquinante a conferma dell'ipotesi iniziale che l'inserimento di prodotti naturali, seppur di scarto, all'interno della composizione dei PCPs possa essere buona pratica per la salvaguardia della salute delle specie e della salute umana.

Quelli riportati nel presente lavoro rappresentano, tuttavia, dati esigui se si pensa che ogni giorno vengono immessi nel mercato globale prodotti dalle composizioni innovative la cui interazione con l'ambiente e le comunità è ignota. Pertanto, risulta imperativo continuare la ricerca su questo fronte aumentando le nostre conoscenze in materia per giungere a una corretta prevenzione e mantenimento della salute ambientale salvaguardando così anche la salute umana.

7. Bibliografia

- Al-Asmakh, M., Majdalawieh, A. F., Abdullah, A. M., Younes, N., Da'as, S. I., Radwan, A. B., Sliem, M. H., Cherif, H.E., Pintus, G., & Nasrallah, G. K. (2020). AEO-7 surfactant is "super-toxic" and induces severe cardiac, liver and locomotion damage in zebrafish embryos. *Environmental Sciences Europe*, 32, 1-12.
- Albanese, K. A., Lanno, R. P., Hadad, C. M., & Chin, Y. P. (2017). Photolysis-and dissolved organic matter-induced toxicity of triclocarban to *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology Letters*, 4(11), 457-462.
- Ali, S., Mil, H. G. V., & Richardson, M. K. (2011). Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. *PloS one*, 6(6), e21076.
- Aliko, V., Hajdaraj, G., Caci, A., & Faggio, C. (2015). Copper induced lysosomal membrane destabilisation in haemolymph cells of Mediterranean green crab (*Carcinus aestuarii*, Nardo, 1847) from the Narta Lagoon (Albania). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(5), 750-756.
- Aliko, V., Vasjari, L., Ibrahimi, E., Impellitteri, F., Karaj, A., Gjonaj, G., Piccione, G., Arfuso, F., Faggio, C., & Istifli, E. S. (2024). "From shadows to shores"-quantitative analysis of CuO nanoparticle-induced apoptosis and DNA damage in fish erythrocytes: A multimodal approach combining experimental, image-based quantification, docking and molecular dynamics. *Science of the Total Environment*, 906, 167698.
- Aliverti, M., 2023. Pulizia del corpo, igiene della persona e ricerca della bellezza. Un excursus storico-antropologico.
https://assets.unifarco.it/museo/it/Assets/riviste/documenti/rivfarm_apr_2023_aliverti.pdf
- Almroth, B. C., Sturve, J., Stephensen, E., Holth, T. F., & Förlin, L. (2008). Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkscrew wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Marine Environmental Research*, 66(2), 271-277.
- Alonso-López, O., López-Ibáñez, S., & Beiras, R. (2021). Assessment of toxicity and biodegradability of poly (vinyl alcohol)-based materials in marine water. *Polymers*, 13(21), 3742.
- Alves, M. H., Jensen, B. E., Smith, A. A., & Zelikin, A. N. (2011). Poly (vinyl alcohol) physical hydrogels: new vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular bioscience*, 11(10), 1293-1313.
- Ahmadniaye Motlagh, H., Horie, Y., Rashid, H., Banaee, M., Multisanti, C. R., & Faggio, C., (2023). Unveiling the effects of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed essential oil as a diet supplement on the biochemical parameters and reproductive function in female common carps (*Cyprinus carpio*). *Water*. 15(16), 2978.
- American Cleaning Institute (ACI). Sodium Lauryl Sulfate. Available at: <https://www.cleaninginstitute.org/industry-priorities/policy/other-issues/sodium-lauryl-sulfate-sls>
- American Society for Testing and Materials. Standard guide for Conducting frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus, ASTM E1439-98: Annual Book of ASTM Standards; ASTM: Philadelphia, PA, USA, 2014; Volume 11.05, pp. 826-836.
- Andersen, K. E., & Hamann, K. (1984). The sensitizing potential of metalworking fluid biocides (phenolic and thiazole compounds) in the guinea-pig maximization test in relation to patch-test reactivity in eczema patients. *Food and Chemical Toxicology*, 22(8), 655-660.

- Antkiewicz, D. S., Burns, C. G., Carney, S. A., Peterson, R. E., & Heideman, W., (2005). Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish. *Toxicological Sciences*, 84(2), 368-377.
- Anton-Pardo, M., Hlaváč, D., Másílko, J., Hartman, P., & Adámek, Z. (2014). Natural diet of mirror and scaly carp (*Cyprinus carpio*) phenotypes in earth ponds. *Folia Zoologica*, 63(4), 229-237.
- Arnold, W. A., Blum, A., Branyan, J., Bruton, T. A., Carignan, C. C., Cortopassi, G., Datta, S., DeWitt, J., Doherty, A.C., Halden, R.U., Harari, H., Hartmann, E.M., Hrubec, T.C., Iyer, S., Kwiatkowski, C.F., LaPier, J., Li, D., Li, L., Muñiz Ortiz, J.G., Salamova, A., Schettler, T., Seguin, R.P., Soehl, A., Sutton, R., Xu, L., & Zheng, G. (2023). Quaternary ammonium compounds: a chemical class of emerging concern. *Environmental Science & Technology*, 57(20), 7645-7665.
- Arrigo, F., Arfuso, F., Impellitteri, F., Giannetto, C., Piccione, G., & Faggio, C. (2023). Blood from horses and cows *in vitro* exposed to quaternium-15 and thiacloprid: haematology and erythrocyte osmotic fragility alterations. *Applied Sciences*, 13(7), 4413.
- Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., & Mayden, R. L. (2013). Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*, 10(1), 1-14.
- Asimakopoulou, A. G., Xue, J., De Carvalho, B. P., Iyer, A., Abualnaja, K. O., Yaghmoor, S. S., Kumosani, T. A., & Kannan, K. (2016). Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environmental Research*, 150, 573-581.
- Asio, J. R. G., Garcia, J. S., Antonatos, C., Sevilla-Nastor, J. B., & Trinidad, L. C., (2023). Sodium lauryl sulfate and its potential impacts on organisms and the environment: A thematic analysis. *Emerging Contaminants*, 100205.
- Audira, G., Siregar, P., Chen, J. R., Lai, Y. H., Huang, J. C., & Hsiao, C. D. (2020). Systematical exploration of the common solvent toxicity at whole organism level by behavioral phenomics in adult zebrafish. *Environmental Pollution*, 266, 115239.
- Auguste, M., Lasa, A., Balbi, T., Pallavicini, A., Vezzulli, L., & Canesi, L. (2020). Impact of nanoplastics on hemolymph immune parameters and microbiota composition in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 159, 105017.
- Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E., & Brito-Melo, G. E. A. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47, 307-315.
- Ayhan, M. M., Katalay, S., & Günel, A. Ç. (2021). How pollution effects the immune systems of invertebrate organisms (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819). *Marine Pollution Bulletin*, 172, 112750.
- Babalola, O. O., Truter, J. C., & Van Wyk, J. H. (2021). Lethal and teratogenic impacts of imazapyr, diquat dibromide, and glufosinate ammonium herbicide formulations using frog embryo teratogenesis assay-xenopus (FETAX). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 708-716.
- Bachour, R. L., Golovko, O., Kellner, M., & Pohl, J. (2020). Behavioral effects of citalopram, tramadol, and binary mixture in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere*, 238, 124587.
- Balázs, A., Krifaton, C., Orosz, I., Szoboszlai, S., Kovács, R., Csenki, Z., Urbányi, B., & Kriszt, B. (2016). Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131, 45-53.

- Balbi, T., Ciacci, C., Grasselli, E., Smerilli, A., Voci, A., & Canesi, L. (2017). Utilization of *Mytilus* digestive gland cells for the *in vitro* screening of potential metabolic disruptors in aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 191, 26-35.
- Balon, E. K. (2006). The oldest domesticated fishes, and the consequences of an epigenetic dichotomy in fish culture. *Aqua: Journal of Ichthyology & Aquatic Biology*, 11(2), 47-87.
- Baker, M. I., Walsh, S. P., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2012). A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100(5), 1451-1457.
- Banaee, M., Impellitteri, F., Multisanti, C. R., Sureda, A., Arfuso, F., Piccione, G., & Faggio, C. (2023). Evaluating silymarin extract as a potent antioxidant supplement in diazinon-exposed rainbow trout: oxidative stress and biochemical parameter analysis. *Toxics*, 11(9), 737.
- Barboza, L. G. A., & Gimenez, B. C. G. (2015). Microplastics in the marine environment: current trends and future perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, 97(1-2), 5-12.
- Barmo, C., Ciacci, C., Canonico, B., Fabbri, R., Cortese, K., Balbi, T., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., & Canesi, L. (2013). *In vivo* effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 132, 9-18.
- Barooah, B., Sharma, K., & Kaushik, G. (2023). Role of microbial enzymes in degradation of personal care products present in environmental matrices in *Microbial Degradation and Detoxification of Pollutants*, Shah, M., (Eds) Berlin, Boston: De Gruyter, pp. 21-50.
- Barus, V. (2002). *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758) in *The freshwater fishes of Europe*, Bănărescu, P.M., Paepke, H.J. (Eds), Aula Verlag, vol. 5, 85-179.
- Basketter, D. A., Rodford, R., Kimber, I., Smith, I., & Wahlberg, J. E. (1999). Skin sensitization risk assessment: a comparative evaluation of 3 isothiazolinone biocides. *Contact Dermatitis*, 40(3), 150-154.
- Becker, L. C., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Klaassen, C. D., Hill, R., Leibler, D., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., & Andersen, F. A. (2010). Final report of the amended safety assessment of quaternium-15 as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 29(3_suppl), 98S-114S.
- Bennett, D. H., Ritz, B., Cassady, D. L., Lee, K., & Hertz-Picciotto, I. (2010). Usage pattern of personal care products in California households. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3109-3119.
- Bertuglia, S., Veronese, F. M., & Pasut, G. (2006). Polyethylene glycol and a novel developed polyethylene glycol-nitric oxide normalize arteriolar response and oxidative stress in ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(4), H1536-H1544.
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L., & Schøyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. *Marine Environmental Research*, 130, 338-365.
- Bhattacharya, R., Chatterjee, A., Chatterjee, S., & Saha, N. C., (2022). Commonly used surfactants sodium dodecyl sulphate, cetylpyridinium chloride and sodium laureth sulphate and their effects on antioxidant defence system and oxidative stress indices in *Cyprinus carpio* L.: An integrated *in silico* and *in vivo* approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 30622-30637.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.

- Blahova, J., Doubkova, V., Plhalova, L., Lakdawala, P., Medkova, D., Vecerek, V., Svobodova, Z., & Faggio, C. (2021). Embryotoxicity of selective serotonin reuptake inhibitors—Comparative sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) and African clawed frog (*Xenopus laevis*) embryos. *Applied Science*, 11(21), 10015.
- Bland, A.S., LHS Market, Global Surfactants Industry. <https://Ihsmarkit.Com/Research-Analysis/Global-Surfactants-Industry.Html>
- Blum, M., & Ott, T. (2019). *Xenopus*: an undervalued model organism to study and model human genetic disease. *Cells Tissues Organs*, 205(5-6), 303-313.
- Bollmann, U. E., Vollertsen, J., Carmeliet, J., & Bester, K. (2014). Dynamics of biocide emissions from buildings in a suburban stormwater catchment—Concentrations, mass loads and emission processes. *Water Research*, 56, 66-76.
- Bondi, C. A., Marks, J. L., Wroblewski, L. B., Raatikainen, H. S., Lenox, S. R., & Gebhardt, K. E., (2015). Human and environmental toxicity of sodium lauryl sulfate (SLS): evidence for safe use in household cleaning products. *Environmental Health Insights*, 9, EHI-S31765.
- Borodinsky, L. N. (2017). *Xenopus laevis* as a model organism for the study of spinal cord formation, development, function and regeneration. *Frontiers in Neural Circuits*, 11, 90.
- Brunelli, E., Talarico, E., Corapi, B., Perrotta, I., & Tripepi, S. (2008). Effects of a sublethal concentration of sodium lauryl sulphate on the morphology and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the gill of the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 436-445.
- Burgos-Aceves, M. A., & Faggio, C. (2017). An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: physiology and molecular aspects. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 513-517.
- Burgos-Aceves, M. A., Abo-Al-Ela, H. G., & Faggio, C. (2021). Impact of phthalates and bisphenols plasticizers on haemocyte immune function of aquatic invertebrates: A review on physiological, biochemical, and genomic aspects. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126426.
- Bury, D., Weber, T., Ebert, K. E., Zülz, S., Brüning, T., Koch, H. M., & Kolossa-Gehring, M. (2023). Increasing exposure to the UV filters octocrylene and 2-ethylhexyl salicylate in Germany from 1996 to 2020: Human biomonitoring in 24-h urine samples of the German Environmental Specimen Bank (ESB). *Environment International*, 182, 108334.
- Caballero, M. V., & Candiracci, M. (2018). Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. *Journal of Unexplored Medicine Data*, 3(4), 1-14.
- Campos, D., Gravato, C., Fedorova, G., Burkina, V., Soares, A. M., & Pestana, J. L. (2017). Ecotoxicity of two organic UV-filters to the freshwater caddisfly *Sericostoma vittatum*. *Environmental Pollution*, 228, 370-377.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., & Pruzzo, C. (2002). Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 57(6), 469-476.
- Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L. C., Betti, M., Gallo, G., Pojana, G., & Marcomini, A. (2007). Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non-target organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(3), 464-472.
- Carballal, M. J., López, C., Azevedo, C., & Villalba, A. (1997). *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 7(6), 403-416.

- Carlson, A. R., & Siefert, R. E. (1974). Effects of reduced oxygen on the embryos and larvae of lake trout (*Salvelinus namaycush*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 31(8), 1393-1396.
- Carlsson, G., & Norrgren, L. (2004). Synthetic musk toxicity to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, 102-105.
- Carotenuto, R., Capriello, T., Cofone, R., Galdiero, G., Fogliano, C., & Ferrandino, I. (2020). Impact of copper in *Xenopus laevis* liver: Histological damages and atp7b downregulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188, 109940.
- Carve, M., Nuggeoda, D., Allinson, G., & Shimeta, J. (2021). A systematic review and ecological risk assessment for organic ultraviolet filters in aquatic environments. *Environmental Pollution*, 268, 115894.
- Casellas, A. M., Guardiola, H., & Renaud, F. L. (1991). Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. *Neuropeptides*, 18(1), 35-40.
- Castro, P., & Huber, M.E., 2011. Marine Biology. Edizione Italiana, Sandulli, R., Giaccone, G., & Tursi, A. (Eds.), The McGraw – Hill Companies, S.r.l., Milano.
- Catalano, A., Iacopetta, D., Pellegrino, M., Aquaro, S., Franchini, C., & Sinicropi, M. S. (2021). Diarylureas: Repositioning from antitumor to antimicrobials or multi-target agents against new pandemics. *Antibiotics*, 10(1), 92.
- Chaudhari, U., Nemade, H., Sureshkumar, P., Vinken, M., Ates, G., Rogiers, V., Hescheler, J., Hengstler, J. G., & Sachinidis, A. (2018). Functional cardiotoxicity assessment of cosmetic compounds using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Archives of Toxicology*, 92, 371-381.
- Chavoshani, A., Hashemi, M., Amin, M. M., & Ameta, S. C. (2020). Personal care products as an endocrine disrupting compound in the aquatic environment. In *Micropollutants and Challenges*, Chavoshani, A., Hashemi, M., Amin, M. M., Ameta, S. C. (Eds). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, pp. 91-144.
- Chen, L., Xu, J., Sun, X., & Xu, P. (2022). Research advances and future perspectives of genomics and genetic improvement in allotetraploid common carp. *Reviews in Aquaculture*, 14(2), 957-978.
- Cheng, J., Flahaut, E., & Cheng, S. H. (2007). Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(4), 708-716.
- Childers, C. L., & Storey, K. B. (2019). Purification and characterization of a urea sensitive lactate dehydrogenase from skeletal muscle of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Physiology B*, 189, 271-281.
- Chirani, M. R., Kowsari, E., Teymourian, T., & Ramakrishna, S. (2021). Environmental impact of increased soap consumption during COVID-19 pandemic: Biodegradable soap production and sustainable packaging. *Science of the Total Environment*, 796, 149013.
- Collier, P. J., Ramsey, A., Waigh, R. D., Douglas, K. T., Austin, P., & Gilbert, P. (1990). Chemical reactivity of some isothiazolone biocides. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(4), 578-584.
- Copp, G. H., Bianco, P. G., Bogutskaya, N. G., Erős, T., Falka, I., Ferreira, M. T., Fox, M. H., Freyhof, J., Gozlan, R. E., Grabowska, J., Kováč, V., Moreno-Amich, R., Naseka, A. M., Peñáz, M., Povž, M., Przybylski, M., Robillard, M., Russell, I C., Stakenas, S., Šumer, S., Vila-Gispert, A., & Wiesner, C. (2005). To be, or not to be, a non-native freshwater fish? *Journal of Applied Ichthyology*, 21(4), 242-262.

Cosmetica Italiana, 2023. Rapporto Annuale. 55^a analisi del settore e dei consumi cosmetici in Italia nel 2022.

Cruz, P., Cuccaro, A., Pretti, C., He, Y., Soares, A. M., & Freitas, R. (2023). Comparative subcellular responses to pharmaceutical exposures in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: An *in vitro* study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 104, 104314.

Cserhádi, T., Forgács, E., & Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28(5), 337-348.

CTFA Compendium of Cosmetic Ingredient Composition: Cosmetic Ingredient Descriptions. Washington, DC: Cosmetic Toiletry and Fragrance Association; 1982.

Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J., & Larreta, J. (2015). Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquatic Toxicology*, 162, 152-164.

Curpan, A. S., Impellitteri, F., Plavan, G., Ciobica, A., & Faggio, C. (2022). *Mytilus galloprovincialis*: An essential, low-cost model organism for the impact of xenobiotics on oxidative stress and public health. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 256, 109302.

Dahms-Verster, S., Nel, A., van Vuren, J. H., & Greenfield, R. (2023). Mortality and malformation effects of acute vanadium (V) exposure on the African clawed frog (*Xenopus laevis*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(19), 55730-55741.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1-2), 23-38.

Dar, O. I., Aslam, R., Pan, D., Sharma, S., Andotra, M., Kaur, A., Jia, A. Q., & Faggio, C. (2022). Source, bioaccumulation, degradability and toxicity of triclosan in aquatic environments: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102122.

David, L., Blum, S., Feldman, M. W., Lavi, U., & Hillel, J. (2003). Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution*, 20(9), 1425-1434.

De Busschere, C., Courant, J., Herrel, A., Rebelo, R., Rödder, D., Measey, G. J., & Backeljau, T. (2016). Unequal contribution of native South African phylogeographic lineages to the invasion of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, in Europe. *PeerJ*, 4, e1659.

De Mello, W. C. (2014). Regulation of cell volume and water transport—An old fundamental role of the renin angiotensin aldosterone system components at the cellular level. *Peptides*, 58, 74-77.

Díaz-Cruz, M. S., Gago-Ferrero, P., Llorca, M., & Barceló, D. (2012). Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 2325-2333.

Dos Santos Almeida, S., Rocha, T. L., Qualhato, G., Oliveira, L. D. A. R., do Amaral, C. L., da Conceicao, E. C., Texeira de Sabóia-Morais, S. M., & Bailão, E. F. L. C. (2019). Acute exposure to environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induced genotoxicity in *Poecilia reticulata*. *Aquatic Toxicology*, 216, 105293.

Donato, G., Vázquez-Luis, M., Nebot-Colomer, E., Lunetta, A., & Giacobbe, S. (2021). Noble fan-shell, *Pinna nobilis*, in Lake Faro (Sicily, Italy): Ineluctable decline or extreme opportunity?. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 261, 107536.

- Downs, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., Ciner, F. R., Jeger, R., Lichtenfeld, Y., Woodley, C. M., Pennington, P., Cadenas, K., Kushmaro, A., & Loya, Y. (2016). Toxicopathological effects of the sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the US Virgin Islands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(2), 265-288.
- Duis, K., Junker, T., & Coors, A. (2022). Review of the environmental fate and effects of two UV filter substances used in cosmetic products. *Science of The Total Environment*, 808, 151931.
- Ebele, A. J., Abdallah, M. A. E., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1), 1-16.
- Eggert, C., & Fouquet, A. (2006). A preliminary biotelemetric study of a feral invasive *Xenopus laevis* population in France. *Alytes*, 23(3/4), 144.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A., & Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, 4(1), 21-40.
- Environmental Protection Agency (EPA), 2011. Label Change Notification. Re: ACTICIDE B20 EPA Registration No. 67071-22. U.S. Environmental Protection Agency, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.
- Environmental Protection Agency, 40 Cfr Part 180 [EpaeHqeOppe2018e0763; Frle9999e81] Sodium Lauryl Sulfate; Exemption from the Requirement of A Tolerance, October 2, 2019. Retrieved November 8, 2021, From Federalregister.Gov: <https://www.federalregister.gov/documents/2019/10/02/2019-21121/sodium-lauryl-sulfate-exemption-from-the-requirement-of-a-tolerance>
- European Chemicals Agency. 2022. Information on Chemicals. Available: <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals>.
- EU (2007). Council Directive of July 27, 1976, on the approximation of the laws of the Member States. relating to cosmetic products. 76/768/EEC. At: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20070508>
- European Commission, Scientific Committee on Consumer Products. Opinion on Triclocarban for Other Uses than as a Preservative; Colipa no. P29. SCCP/0851/04; European Commission: Brussels, Belgium, 2005.
- European commission, 2017. Commission Regulation (EU) 2017/238.
- European Commission (2020) Fitness check on endocrine disruptors. Commission Staff Working document. SWD (2020) 251 final. [b24e10f7-5bf6-4036-81a5-7a799209d1fe_en \(europa.eu\)](https://ec.europa.eu/health/scientific_committee_on_consumer_products/docs/swd_2020_251_en.pdf)
- European Union, 2021. Cosmetic ingredient database (CosIng). List of UV filters allowed in cosmetic products. Annex VI. http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/pdf/COSING_Annex%20VI_v2.pdf.
- Faggio, C., Pagano, M., Alampi, R., Vazzana, I., & Felice, M. R. (2016). Cytotoxicity, haemolymphatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 180, 258-265.
- Faggio, C., Tsarpali, V., & Dailianis, S. (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: an overview. *Science of the Total Environment*, 636, 220-229.

- Falcone, R., Umaru, N., & Salek, S. (2024). Development of a Consumer Reported Outcome Measure for Personal Care Products: The Rationale. *International Journal of Scientific & Technology Research (IJSTR)*.
- Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Horyn, O., & Stoliar, O. B. (2017). Vulnerability of marsh frog *Pelophylax ridibundus* to the typical wastewater effluents ibuprofen, triclosan and estrone, detected by multi-biomarker approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 202, 26-38.
- Farrington, J. W., Tripp, B. W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J. L., Wade, T. L., & Knap, A. H. (2016). Edward D. Goldberg's proposal of "the mussel watch": reflections after 40 years. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 501-510.
- Fasth, I. M., Ulrich, N. H., & Johansen, J. D. (2018). Ten-year trends in contact allergy to formaldehyde and formaldehyde-releasers. *Contact Dermatitis*, 79(5), 263-269.
- Fatma, N., Panda, M., & Ansari, W. H. (2015). Environment-friendly ester bonded gemini surfactant: mixed micellization of 14-E2-14 with ionic and nonionic conventional surfactants. *Journal of Molecular Liquids*, 211, 247-255.
- Fedeila, M., Hachaïchi-Sadouk, Z., Bautista, L. F., Simarro, R., & Nateche, F. (2018). Biodegradation of anionic surfactants by *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* strains isolated from industrial wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 629-635.
- Feinstein, D., & Collins, S. (2018). The personal care products safety Act. *JAMA Internal Medicine*, 178(5), 601-602.
- Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., & Van der Bruggen, B. (2019). Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of the Total Environment*, 654, 324-337.
- Fel, J. P., Lacherez, C., Bensetra, A., Mezzache, S., Béraud, E., Léonard, M., Allemand, D., & Ferrier-Pagès, C. (2019). Photochemical response of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* to some sunscreen ingredients. *Coral Reefs*, 38, 109-122.
- Filice, M., Caferro, A., Amelio, D., Impellitteri, F., Iovine, M. A., Porretti, M., Faggio, C., Gattuso, A., Cerra, M.C., & Imbrogno, S. (2024b). The effects of ACE inhibitor Enalapril on *Mytilus galloprovincialis*: Insights into morphological and functional responses. *Aquatic Toxicology*, 273, 107014.
- Filice, M., Caferro, A., Gattuso, A., Sperone, E., Agnisola, C., Faggio, C., & Cerra, M.C., Imbrogno, S. (2024a). Effects of environmental hypoxia on the goldfish skeletal muscle: Focus on oxidative status and mitochondrial dynamics. *Journal of Contaminant Hydrology*, 261, 104299.
- Filice, M., Leo, S., Mazza, R., Amelio, D., Garofalo, F., Imbrogno, S., Cerra, M.C., & Gattuso, A. (2021). The heart of the adult goldfish *Carassius auratus* as a target of Bisphenol A: A multifaceted analysis. *Environmental Pollution*, 269, 116177.
- Filice, M., Reinerio, F. R., Cerra, M. C., Faggio, C., Leonetti, F. L., Micarelli, P., Giglio, G., Sperone, E., Barca, D., & Imbrogno, S. (2023). Contamination by trace elements and oxidative stress in the skeletal muscle of *Scylliorhinus canicula* from the Central Tyrrhenian Sea. *Antioxidants*, 12(2), 524.
- Fisher, M. C., & Garner, T. W. (2007). The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, 21(1), 2-9.

- Flajšhans, M., & Hulata, G. (2007). Common carp-*Cyprinus carpio*. *Genetic impact of aquaculture activities on native populations*, Corosetti, D. E. Garcia-Vasquez, E., Veerspoor, E. (Eds) *Sixth Framework plan of the EC*, final scientific report, EU, pp. 32-39.
- Fogliano, C., Carotenuto, R., Panzuto, R., Spennato, V., De Bonis, S., Simoniello, P., Raggio, A., Avallone, B., Agnisola, C., & Motta, C. M. (2023). Behavioral alterations and gills damage in *Mytilus galloprovincialis* exposed to an environmental concentration of delorazepam. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 97, 104030.
- Food and Drug Administration (FDA) (2016) Safety and effectiveness of consumer antiseptics; topical antimicrobial drug products for over-the-counter human use. [Federal Register :: Safety and Effectiveness of Consumer Antiseptics; Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use](#)
- Food and Drug Administration (FDA), 2019. <https://www.fda.gov/>.
- Fort, D.J.; Mathis, M. Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX): Use in Alternative Preclinical Safety Assessment. Cold Spring Harb. Protoc. 2018, pdb-prot098319.
- Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Costa, S., Meucci, V., Battaglia, F., Intorre, L., Soares, A. M. V. M., Pretti, C., & Faggio, C. (2020). Toxic impacts induced by Sodium lauryl sulfate in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 242, 110656.
- Freitas, R., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., Soares, A. M., Pretti, C., & Faggio, C. (2021). The influence of salinity on sodium lauryl sulfate toxicity in *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 87, 103715.
- Freitas, R., Arrigo, F., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., Soares, A. M. V. M., Pretti, C., & Faggio, C. (2023). Combined effects of temperature rise and sodium lauryl sulfate in the Mediterranean mussel. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 100, 104132.
- Fruijtier-Pöllöth, C. (2005). Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*, 214(1-2), 1-38.
- Gabriel, L., Barboza, A., Carolina, B., Gimenez, G., 2015. Microplastics in the marine environment: current trends and future perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, 97(1-2), 5-12.
- Gaaz, T. S., Sulong, A. B., Akhtar, M. N., Kadhum, A. A. H., Mohamad, A. B., & Al-Amiery, A. A. (2015). Properties and applications of polyvinyl alcohol, halloysite nanotubes and their nanocomposites. *Molecules*, 20(12), 22833-22847.
- Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2015). UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Science of the Total Environment*, 518, 518-525.
- Gajdos, L., Pietrelli, L., Ciccarello, A., & Derco, J. (2007). Elimination of polyethylene glycol from aqueous solution using activated carbon. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3), 385.
- Garcia-Hidalgo, E., Schneider, D., von Goetz, N., Delmaar, C., Siegrist, M., & Hungerbühler, K. (2018). Aggregate consumer exposure to isothiazolinones via household care and personal care products: Probabilistic modelling and benzisothiazolinone risk assessment. *Environment International*, 118, 245-256.
- Gardner, J. P., Zbawicka, M., Westfall, K. M., & Wenne, R. (2016). Invasive blue mussels threaten regional scale genetic diversity in mainland and remote offshore locations: the need for baseline data and enhanced protection in the Southern Ocean. *Global Change Biology*, 22(9), 3182-3195.

- Gayathri, M., Sutha, J., Mohanthi, S., Ramesh, M., & Poopal, R. K. (2023). Ecotoxicological evaluation of the UV-filter octocrylene (OC) in embryonic zebrafish (*Danio rerio*): developmental, biochemical and cellular biomarkers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 271, 109688.
- Gervis, M. H., & Sims, N. A. (1992). *The biology and culture of pearl oysters* (Bivalvia: Pteriidae), Gervis, M.H., Sims, N.A. (Eds.), Overseas Development Administration, U.K., International Center for Living Aquatic Resources, Manila, Philippines, Vol. 21.
- Gerstell, E., Marchessou, S., Schmidt, J., & Spagnuolo, E. (2020). How COVID-19 is changing the world of beauty. *McKinsey & Company*, 8.
<https://www.mckinsey.com/~media/McKinsey/Industries/Consumer%20Packaged%20Goods/Our%20Insights/How%20COVID%2019%20is%20changing%20the%20world%20of%20beauty/How-Covid-19-is-changing-the-world-of-beauty-vF.pdf>
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Chaminda, G. T., An, A. K., & Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6, 169-180.
- Gosling, E., M., (2008). *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. Gosling E.M., (Eds.), John Wiley & Sons, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Grand View Research, 2023. Beauty And Personal Care Products Market Size, Share & Trend Analysis Report By Type (Conventional, Organic), By Product (Skin Care, Hair Care, Color Cosmetics, Fragrance), By Distribution Channel, By Region, And Segment Forecasts, 2024 – 2030 at: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/beauty-personal-care-products-market>
- Grumezescu, A. M., (2017). *Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics*, Grumezescu, A.M., (Ed.), Elsevier, Amsterdam (Netherlands).
- Hallare, A. V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H. R., & Triebskorn, R. (2005). Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology*, 30(1), 7-17.
- Hart, L. B., Walker, J., Beckingham, B., Shelley, A., Alten Flagg, M., Wischusen, K., & Sundstrom, B. (2020). A characterization of personal care product use among undergraduate female college students in South Carolina, USA. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 30(1), 97-106.
- Hatami, M., Banaee, M., & Haghi, B. N. (2019). Sub-lethal toxicity of chlorpyrifos alone and in combination with polyethylene glycol to common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 219, 981-988.
- He, T., Tsui, M. M. P., Tan, C. J., Ma, C. Y., Yiu, S. K. F., Wang, L. H., Chen, T.H., Fan, T.Y., Sing Lam, P.K., & Murphy, M. B. (2019). Toxicological effects of two organic ultraviolet filters and a related commercial sunscreen product in adult corals. *Environmental Pollution*, 245, 462-471.
- Hena, S., Gutierrez, L., & Croué, J. P. (2021). Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from wastewater using microalgae: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 124041.
- Heo, J. J., Kim, U. J., & Oh, J. E. (2019). Simultaneous quantitative analysis of four isothiazolinones and 3-iodo-2-propynyl butyl carbamate in hygienic consumer products. *Environmental Engineering Research*, 24(1), 137-143.
- Herron, J. M., Hines, K. M., Tomita, H., Seguin, R. P., Cui, J. Y., & Xu, L. (2019). Multiomics investigation reveals benzalkonium chloride disinfectants alter sterol and lipid homeostasis in the mouse neonatal brain. *Toxicological Sciences*, 171(1), 32-45.

- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E., (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Science*, 86(1), 6-19.
- Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., & Pedersen, S. F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiological Reviews*, 89(1), 193-277.
- Homem, V., Llompart, M., Vila, M., Ribeiro, A. R., Garcia-Jares, C., Ratola, N., & Celeiro, M. (2022). Gone with the flow-assessment of personal care products in Portuguese rivers. *Chemosphere*, 293, 133552.
- Hopkins, W. A. (2007). Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR Journal*, 48(3), 270-277.
- Hou, Y., Chen, C., Liu, K., Tu, Y., Zhang, L., & Li, Y. (2015). Preparation of PVA hydrogel with high-transparency and investigations of its transparent mechanism. *RSC Advances*, 5(31), 24023-24030.
- Hrubec, T. C., Melin, V. E., Shea, C. S., Ferguson, E. E., Garofola, C., Repine, C. M., Chapman, T.W., Patel, H.R., Razvi, M.R., Sugrue, J.E., Potineni, H., Magnin-Bissel, G., & Hunt, P. A. (2017). Ambient and dosed exposure to quaternary ammonium disinfectants causes neural tube defects in rodents. *Birth Defects Research*, 109(14), 1166-1178.
- Hu, W., Culloty, S., Darmody, G., Lynch, S., Davenport, J., Ramirez-Garcia, S., Dawson, K., Lynch, I., Doyle, H., & Sheehan, D. (2015). Neutral red retention time assay in determination of toxicity of nanoparticles. *Marine Environmental Research*, 111, 158-161.
- Huang, Y., Law, J. C. F., Lam, T. K., & Leung, K. S. Y. (2021). Risks of organic UV filters: a review of environmental and human health concern studies. *Science of the Total Environment*, 755, 142486.
- Iacopetta, D., Catalano, A., Ceramella, J., Saturnino, C., Salvagno, L., Ielo, I., Drommi, D., Scali, E., Plutino, M.R., Rosace, G., & Sinicropi, M. S. (2021). The different facets of triclocarban: A review. *Molecules*, 26(9), 2811.
- Impellitteri, F., Multisanti, C. R., Rusanova, P., Piccione, G., Falco, F., & Faggio, C. (2023a). Exploring the impact of contaminants of emerging concern on fish and invertebrates physiology in the Mediterranean Sea. *Biology*, 12(6), 767.
- Impellitteri, F., Yunko, K., Martyniuk, V., Matskiv, T., Lechachenko, S., Khoma, V., Mudra, A., Piccione, G., Stoliar, O., & Faggio, C. (2023b). Physiological and biochemical responses to caffeine and microplastics in *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, 890, 164075.
- Impellitteri, F., Briglia, M., Porcino, C., Stoliar, O., Yunko, K., Germanà, A., Piccione, G., Faggio, C., & Guerrera, M. C. (2024b). The odd couple: Caffeine and microplastics. Morphological and physiological changes in *Mytilus galloprovincialis*. *Microscopy Research and Technique*, 87(5), 1092-1110.
- Impellitteri, F., Riolo, K., Multisanti, C. R., Zicarelli, G., Piccione, G., Faggio, C., & Giannetto, A. (2024a). Evaluating quaternium-15 effects on *Mytilus galloprovincialis*: New insights on physiological and cellular responses. *Science of the Total Environment*, 918, 170568.
- Impellitteri, F., Riolo, K., Zicarelli, G., Porretti, M., Multisanti, C. R., Piccione, G., Giannetto, A., & Faggio, C. (2025). Evaluation of cellular and physiological alterations of cells from *Mytilus galloprovincialis* exposed to benzisothiazolinone. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 290, 117631.
- Irizarry Rovira, A. R., Hilbish, K. G., Schroeder, M., Boorman, G. A., Credille, K. M., Ballard, D., Hanson, J. C., & Niedenthal, A. (2021). Effects of 0.5% and 2.0% Sodium Lauryl Sulfate in Male CD-1 Mice From a 3-Month Oral Gavage Toxicity Study. *Toxicologic Pathology*, 49(5), 1100-1108.

- Ismail, T., Lee, H. K., Kim, C., Kim, Y., Lee, H., Kim, J. H., Kwon, S., Huh, T. L., Khang, D., Kim, S. H., Choi, S.C., & Lee, H. S., (2019). Comparative analysis of the developmental toxicity in *Xenopus laevis* and *Danio rerio* induced by Al₂O₃ nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(12), 2672-2681.
- ISO 7346, 1996. Water Quality—Determination of Acute Lethal Toxicity of Substances to a Freshwater Fish [*Brachydanio rerio* Hailton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]—Part I: Static Method; American National Standards Institute: New York, NY, USA.
- Jones-Costa, M., Franco-Belussi, L., Vidal, F. A. P., Gongora, N. P., Castanho, L. M., Dos Santos, Carvalho C., Silva-Zacarin, E.C.M., Abdalla, F. C., Silveira Duarte, I. C., De Oliveira, C., De Oliveira, C. R., & Salla, R. F., (2018). Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 151, 184-190.
- Jang, H. J., Shin, C. Y., & Kim, K. B. (2015). Safety evaluation of polyethylene glycol (PEG) compounds for cosmetic use. *Toxicological Research*, 31, 105-136.
- Jayaram, K. C. (1999). *The freshwater fishes of the Indian region*, Narendra Publishing House, California, pp. 551.
- Julinová, M., Vaňharová, L., & Jurča, M. (2018). Water-soluble polymeric xenobiotics–Polyvinyl alcohol and polyvinylpyrrolidone–And potential solutions to environmental issues: A brief review. *Journal of Environmental Management*, 228, 213-222.
- Ka, J., & Jin, S. W. (2021). Zebrafish as an emerging model for dyslipidemia and associated diseases. *Journal of Lipid and Atherosclerosis*, 10(1), 42.
- Kanatt, S. R., & Makwana, S. H. (2020). Development of active, water-resistant carboxymethyl cellulose-poly vinyl alcohol-Aloe vera packaging film. *Carbohydrate Polymers*, 227, 115303.
- Karaman, G. E., Ünal, İ., Beler, M., Üstündağ, F. D., Cansız, D., Üstündağ, Ü. V., Cansız, D., Üstündağ, Ü. V., Emekli-Alturfan, E., & Akyüz, S., (2024). Toothpastes for children and their detergent contents affect molecular mechanisms of odontogenesis in zebrafish embryos. *Drug and Chemical Toxicology*, 47(1), 15-25.
- Karempudi, V. K., Gokul, T. A., Kumar, K. R., Veeramanikandan, V., Ali, D., Impellitteri, F., Faggio, C., Ullah, H., Daglia, M., & Balaji, P. (2024). Protective role of *Pleurotus florida* against streptozotocin-induced hyperglycemia in rats: A preclinical study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 170, 116005.
- Katsanevakis, S., Poursanidis, D., Issaris, Y., Panou, A., Petza, D., Vassilopoulou, V., Chaldaïou, I., & Sini, M. (2011). "Protected" marine shelled molluscs: thriving in Greek seafood restaurants. *Mediterranean Marine Science*, 12(2), 429-438.
- Kazi, K. J., English, C. D., Ivantsova, E., Souders II, C. L., & Martyniuk, C. J. (2024). Transcriptome networks and physiology related to cardiac function and motor activity are perturbed in larval zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to the antidepressant citalopram. *Environmental Pollution*, 361, 124767.
- Khalid, M., & Abdollahi, M. (2021). Environmental distribution of personal care products and their effects on human health. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 20(1), 216.
- Khan, F. R., Alhewairini, S. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. *Current Trends in Cancer Management*, 27, 3-18.

- Khandale, D. P., Khinchi, P. J., Chilke, A. M., 2018. Effect of nonylphenol lc-50 on hematological profile of *Ophiocephalus punctatus* (BLOCH, 1793). *Asian Journal of Scientific Technology*, 9, 7409-7413.
- Kim, S., Jung, D., Kho, Y., & Choi, K. (2014). Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)—A two generation exposure study. *Aquatic Toxicology*, 155, 244-252.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310.
- Kirpitchenkov, V. S. (1999). Genetics and breeding of common carp in Hydrobiologie et Aquaculture, Billard, R., Repérant, J., Rio, J.P., Ward, R. (Eds.), Institut National de la Recherche Agronomique, Paris (France), pp. 5-61.
- Kloas, W., Stöck, M., Lutz, I., & Ziková-Kloas, A., (2024). Endocrine disruption in teleosts and amphibians is mediated by anthropogenic and natural environmental factors: implications for risk assessment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 379(1898), 20220505.
- Kolder, I. C. R. M., Van Der Plas-Duivesteyn, S. J., Tan, G., Wiegertjes, G. F., Forlenza, M., Guler, A. T., Travin, D. Y., Nakao, M., Moritomo, T., Irnazarow, I., den Dunnen, J.T., Anvar, S.Y., Jansen, H.J., Dirks, R.P., Palmblad, M., Lenhard, B., Henkel, C.V., & Spaink, H. P. (2016). A full-body transcriptome and proteome resource for the European common carp. *BMC Genomics*, 17, 1-12.
- Kournoutou, G. G., Giannopoulou, P. C., Sazakli, E., Leotsinidis, M., Kalpaxis, D. L., & Dinos, G. P. (2020). Oxidative damage of mussels living in seawater enriched with trace metals, from the viewpoint of proteins expression and modification. *Toxics*, 8(4), 89.
- Kucherenko, S. V., Ovcharenko, A. M., & Pushenko, S. L. (2021). Xenobiotics: a threat to the health of living organisms. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 285, p. 03006). EDP Sciences.
- Kumar, R., Qureshi, M., Vishwakarma, D. K., Al-Ansari, N., Kuriqi, A., Elbeltagi, A., & Saraswat, A. (2022). A review on emerging water contaminants and the application of sustainable removal technologies. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 6, 100219.
- Kumar, S., Talwar, S., Krishnan, S., Kaur, P., & Dhir, A. (2021). Purchasing natural personal care products in the era of fake news? The moderation effect of brand trust. *Journal of Retailing and Consumer Services*, 63, 102668.
- Langford, K. H., Reid, M. J., Fjeld, E., Øxnevad, S., & Thomas, K. V. (2015). Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environment International*, 80, 1-7.
- Lassoued, J., Babarro, J. M., Padín, X. A., Comeau, L. A., Bejaoui, N., & Pérez, F. F. (2019). Behavioural and eco-physiological responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* to acidification and distinct feeding regimes. *Marine Ecology Progress Series*, 626, 97-108.
- Lee, S., Kwon, B., Jeong, J., Kho, Y., & Ji, K. (2023). Thyroid hormone disrupting potentials of benzisothiazolinone in embryo-larval zebrafish and rat pituitary GH3 cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114406.
- Levine, R. L. (1994). Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 246-257.

- Li, A., Chen, Z., Wu, Q. Y., Huang, M. H., Liu, Z. Y., Chen, P., Mei, L., C., & Hu, H. Y. (2016). Study on the removal of benzisothiazolinone biocide and its toxicity: The effectiveness of ozonation. *Chemical Engineering Journal*, 300, 376-383.
- Li, B., Zhang, T., 2011. Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 83, 1284-1289.
- Li, M. H. (2012). Survival, mobility, and membrane-bound enzyme activities of freshwater planarian, *Dugesia japonica*, exposed to synthetic and natural surfactants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(4), 843-850.
- Li, H. M., Zhang, Y. C., Li, Y. Y., Zhu, Q. Q., Li, J., Xu, H. M., Xiong, Y.M., Qin, Z. F. (2023). Low concentrations of benzophenone-type UV-filters impair testis development in the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 254, 106371.
- Licht, L. E. (1985). Uptake of ¹⁴C DDT by wood frog embryos after short-term exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 81(1), 117-119.
- Lillo, F., Dufresnes, C., Faraone, F. P., Lo Valvo, M., & Stöck, M. (2013). Identification and potential origin of invasive clawed frogs *Xenopus* (Anura: Pipidae) in Sicily based on mitochondrial and nuclear DNA. *Italian Journal of Zoology*, 80(4), 566-573.
- Lillo, F., Faraone, F. P., & Lo Valvo, M. (2011). Can the introduction of *Xenopus laevis* affect native amphibian populations? Reduction of reproductive occurrence in presence of the invasive species. *Biological Invasions*, 13, 1533-1541.
- Liu, H., Sun, P., Liu, H., Yang, S., Wang, L., & Wang, Z. (2015). Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to four benzophenone UV filters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 116-122.
- Liu, W. R., Yang, Y. Y., Liu, Y. S., Zhao, J. L., Zhang, Q. Q., Yao, L., Zhang, M., Jiang, Y.X., Wei, X.D., & Ying, G. G. (2018). Biocides in the river system of a highly urbanized region: A systematic investigation involving runoff input. *Science of the Total Environment*, 624, 1023-1030.
- Lugg, M. J. (2001). Photodegradation of the biocide 1, 2-benziothiazolin-3-one used in a paper-based jointing material. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48(1-4), 252-254.
- Lushchak, V. I., (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.
- Lyu, Y., Li, G., He, Y., Li, Y., & Tang, Z. (2022). Occurrence and distribution of organic ultraviolet absorbents in soils and plants from a typical industrial area in South China. *Science of the Total Environment*, 846, 157383.
- Machałowski, T., & Jesionowski, T. (2021). Hemolymph of molluscan origin: from biochemistry to modern biomaterials science. *Applied Physics A*, 127, 1-22.
- Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, O. E., De Witte, P. A., Esguerra, C. V., & Crawford, A. D. (2012). Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. *PlosOne*, 7(10): e43850.
- Maria, J. P., Bhuvaneswari, R., Nagarajan, V., & Chandiramouli, R. (2019). Diethanolamine and quaternium-15 interaction studies on antimonene nanosheet based on first-principles studies. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1157, 19-27.

- Marinou, K. A., & Dontas, I. A. (2023). European Union Legislation for the Welfare of Animals Used for Scientific Purposes: Areas Identified for Further Discussion. *Animals*, 13(14), 2367.
- Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469-474.
- Marks Jr, J. G., Belsito, D. V., DeLeo, V. A., Fowler Jr, J.F., Fransway, A. F., Maibach, H. I., Mathias, C.G.T., Nethercott, J.R., Rietschel, R.L., Sherertz, E.F., Storrs, F.J., & Taylor, J. S. (1998). North American Contact Dermatitis Group patch test results for the detection of delayed-type hypersensitivity to topical allergens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 38(6), 911-918.
- Martinez-Haro, M., Pais-Costa, A. J., Verdelhos, T., Marques, J. C., & Acevedo, P. (2016). Optimising a clearance index based on neutral red as an indicator of physiological stress for bivalves. *Ecological Indicators*, 71, 514-521.
- Mateo, D. R., Greenwood, S. J., Araya, M. T., Berthe, F.C., Johnson, G. R., & Siah, A. (2010). Differential gene expression of γ -actin, Toll-like receptor 2 (TLR-2) and interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in *Mya arenaria* haemocytes induced by *in vivo* infections with two *Vibrio splendidus* strains. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(7), 710-714.
- May, R. C., & Machesky, L. M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 114(6), 1061-1077.
- Measey, G. J. (1998). Diet of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, UK. *Journal of Zoology*, 246(3), 287-298.
- Measey, G. J. (2016). Overland movement in African clawed frogs (*Xenopus laevis*): a systematic review. *PeerJ*, 4, e2474.
- Measey, G. J., Rödder, D., Green, S. L., Kobayashi, R., Lillo, F., Lobos, G., Rebelo, R., & Thirion, J. M. (2012). Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review. *Biological Invasions*, 14, 2255-2270.
- Medkova, D., Hollerova, A., Riesova, B., Blahova, J., Hodkovicova, N., Marsalek, P., Doubkova, V., Weiserova, Z., Mares, J., Faldyna, M., Tichy, F., Svobodova, Z., & Lakdawala, P. (2023). Pesticides and parabens contaminating aquatic environment: acute and sub-chronic toxicity towards early-life stages of freshwater fish and amphibians. *Toxics*, 11(4), 333.
- Meijer, A.H., Spaink, H.P., (2011). Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Current Drug Targets*, 12(7), 1000-1017.
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P., & Woutersen, R. A. (2011). Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39(5), 759-775.
- Merola, C., Lai, O., Conte, A., Crescenzo, G., Torelli, T., Alloro, M., & Perugini, M. (2020a). Toxicological assessment and developmental abnormalities induced by butylparaben and ethylparaben exposure in zebrafish early-life stages. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, 103504.
- Merola, C., Perugini, M., Conte, A., Angelozzi, G., Bozzelli, M., & Amorena, M. (2020b). Embryotoxicity of methylparaben to zebrafish (*Danio rerio*) early-life stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 236, 108792.

- Meşeli, S., Kaplan, G., Cansız, D., Üstündağ, Ü. V., İsmail, Ü. N. A. L., Alturfan, E. E., Yanikoğlu, F., & Tağtekin, D. (2021). The biocompatibility of sodium lauryl sulphate on developing zebrafish embryos. *Experimed*, 11(2), 67-72.
- Messina, C. M., Faggio, C., Laudicella, V. A., Sanfilippo, M., Trischitta, F., & Santulli, A. (2014). Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on stress response in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*): Regulatory volume decrease (Rvd) and modulation of biochemical markers related to oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 157, 94-100.
- Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: development of a vertebrate model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1), e19.
- Miglioli, A., Tredez, M., Boosten, M., Sant, C., Carvalho, J. E., Dru, P., Canesi, L., Schubert, M., & Dumollard, R. (2024). The Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: a novel model for developmental studies in mollusks. *Development*, 151(4), dev202256.
- Mikula, P., Hollerova, A., Hodkovicova, N., Doubkova, V., Marsalek, P., Franc, A., Sedlackova, L., Hesova, R., Modra, H., Svobodova, Z., & Blahova, J. (2024). Long-term dietary exposure to the non-steroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and ibuprofen can affect the physiology of common carp (*Cyprinus carpio*) on multiple levels, even at “environmentally relevant” concentrations. *Science of the Total Environment*, 917, 170296.
- Miller, I. B., Pawlowski, S., Kellermann, M. Y., Petersen-Thiery, M., Moeller, M., Nietzer, S., & Schupp, P. J. (2021). Toxic effects of UV filters from sunscreens on coral reefs revisited: regulatory aspects for “reef safe” products. *Environmental Sciences Europe*, 33(1), 74.
- Møller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A., & Rao, R. S. P. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of Proteomics*, 74(11), 2228-2242.
- Mondol, R. K., Islam, S., & Alam, S. (2006). Characterization of different strains of common carp (*Cyprinus carpio* L.) (Cyprinidae, Cypriniformes) in Bangladesh using microsatellite DNA markers. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 626-633.
- 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.
- Moore, M. N., Readman, J. A., Readman, J. W., Lowe, D. M., Frickers, P. E., & Beesley, A. (2009). Lysosomal cytotoxicity of carbon nanoparticles in cells of the molluscan immune system: an *in vitro* study. *Nanotoxicology*, 3(1), 40-45.
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Liu, G., Balaram, V., Ribeiro, A. R. L., Lu, Z., Stock, F., Carmona, E., Teixeira, M.R., Picos-Corrales, L.A., Moreno-Piraján, J.C., Giraldo, L., Li, C., Pandey, A., Hocquet, D., Torri, G., & Crini, G. (2022). Worldwide cases of water pollution by emerging contaminants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 20(4), 2311-2338.
- Moutopoulos, D. K., Ramfos, A., Theodorou, J. A., & Katselis, G. (2021). Biological aspects, population and fishery dynamics of the non-indigenous pearl oyster *Pinctada imbricata radiata* (Leach, 1814) in the Eastern Mediterranean. *Regional Studies in Marine Science*, 45, 101821.
- Multisanti, C. R., Riolo, K., Impellitteri, F., Chebbi, I., Faggio, C., & Giannetto, A. (2023). Short-term *in vitro* exposure of *Pinctada imbricata*'s haemocytes to quaternium-15: exploring physiological and cellular responses. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 101, 104198.

- Multisanti, C. R., Zicarelli, G., Caferro, A., Filice, M., Faggio, C., Vazzana, I., Blahova, J., Lakdawala, P., Cerra, M.C., Imbrogno, S., Impellitteri, F. (2024). From Personal Care to Coastal Concerns: Investigating Polyethylene Glycol Impact on Mussel's Antioxidant, Physiological, and Cellular Responses. *Antioxidants*, 13(6), 734.
- Musee, N. (2018). Environmental risk assessment of triclosan and triclocarban from personal care products in South Africa. *Environmental Pollution*, 242, 827-838.
- Nardi, A., Mincarelli, L. F., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., & Regoli, F. (2017). Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 169, 493-502.
- Nascimento, Í. F., Guimarães, A. T. B., Ribeiro, F., de Lima Rodrigues, A. S., Estrela, F. N., da Luz, T. M., & Malafaia, G. (2021). Polyethylene glycol acute and sub-lethal toxicity in neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Anura, Leptodactylidae). *Environmental Pollution*, 283, 117054.
- Nagel, R., (2002). DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, 19, 38-48.
- Nelson J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H., (2016). Fishes of the world, 5th ed., Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H., (Eds.), John Wiley & Sons Inc., New York pp. 181-185.
- Nenni, M. J., Fisher, M. E., James-Zorn, C., Pells, T. J., Ponferrada, V., Chu, S., Fortriede, J.D., Burns, K.A., Wang, Y., Lotay, V.S., Wang, D.Z., Segerdell, E., Chaturvedi, P., Karimi, K., Vize, P.D., & Zorn, A. M. (2019). Xenbase: facilitating the use of *Xenopus* to model human disease. *Frontiers in Physiology*, 10, 154.
- Nigro, L., Magni, S., Ortenzi, M. A., Gazzotti, S., Della Torre, C., & Binelli, A. (2022). Are "liquid plastics" a new environmental threat? The case of polyvinyl alcohol. *Aquatic Toxicology*, 248, 106200.
- Nikle, A., Ericson, M., & Warshaw, E. (2019). Formaldehyde release from personal care products: chromotropic acid method analysis. *Dermatitis*, 30(1), 67-73.
- Nogueira, L., Mello, D. F., Trevisan, R., Garcia, D., da Silva Acosta, D., Dafre, A. L., & de Almeida, E. A. (2017). Hypoxia effects on oxidative stress and immunocompetence biomarkers in the mussel *Perna perna* (Mytilidae, Bivalvia). *Marine Environmental Research*, 126, 109-115.
- Nohynek, G. J., Antignac, E., Re, T., & Toutain, H. (2010). Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(2), 239-259.
- Novick, R. M., Nelson, M. L., Unice, K. M., Keenan, J. J., & Paustenbach, D. J. (2013). Estimation of the safe use concentrations of the preservative 1, 2-benzisothiazolin-3-one (BIT) in consumer cleaning products and sunscreens. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 60-66.
- OECD, 2013. OECD guidelines for the testing of chemicals, test no. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Publishing.
- Oliveira, R., Domingues, I., Koppe Grisolia, C., & Soares, A. M. (2009). Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 679-688.
- Omidi, A. H., Adel, M., Bahri, A. H., Yahyavi, M., Mohammadizadeh, F., Impellitteri, F., & Faggio, C. (2024). Synergistic dietary influence of fermented red grape vinegar and *Lactobacillus acidophilus* on growth performance, carcass composition, and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Reports*, 36, 102122.

- Orrù, F., Deiana, A. M., & Cau, A. (2010). Introduction and distribution of alien freshwater fishes on the island of Sardinia (Italy): an assessment on the basis of existing data sources. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 46-52.
- Osuoha, J. O., Anyanwu, B. O., & Ejileugha, C. (2023). Pharmaceuticals and personal care products as emerging contaminants: Need for combined treatment strategy. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 9, 100206.
- Ozáez, I., Morcillo, G., & Martínez-Guitarte, J. L. (2016). Ultraviolet filters differentially impact the expression of key endocrine and stress genes in embryos and larvae of *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*, 557, 240-247.
- Paciello, S., Russo, T., De Marchi, L., Soares, A. M., Meucci, V., Pretti, C., He, Y., Della Torre, C., & Freitas, R. (2023). Sub-lethal effects induced in *Mytilus galloprovincialis* after short-term exposure to sodium lauryl sulfate: Comparison of the biological responses given by mussels under two temperature scenarios. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 270, 109644.
- Pagano, M., Capillo, G., Sanfilippo, M., Palato, S., Trischitta, F., Manganaro, A., & Faggio, C. (2016). Evaluation of functionality and biological responses of *Mytilus galloprovincialis* after exposure to quaternium-15 (methenamine 3-chloroallylochloride). *Molecules*, 21(2), 144.
- Pagano, M., Fabrello, J., Multisanti, C. R., Zicarelli, G., Ciscato, M., Boldrin, F., Giacobbe, S., Matozzo, V., & Faggio, C. (2023). A first insight into haemocytes of *Pinctada imbricata radiata*: A morpho-functional characterization. *Microscopy Research and Technique*, 86(3), 368-377.
- Pagano, M., Porcino, C., Briglia, M., Fiorino, E., Vazzana, M., Silvestro, S., & Faggio, C. (2017). The influence of exposure of cadmium chloride and zinc chloride on haemolymph and digestive gland cells from *Mytilus galloprovincialis*. *International Journal of Environmental Research*, 11, 207-216.
- Pagano, M., Savoca, S., Impellitteri, F., Albano, M., Capillo, G., & Faggio, C. (2022). Toxicological evaluation of acetylsalicylic acid in non-target organisms: chronic exposure on *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Frontiers in Physiology*, 13, 920952.
- Panara, F., Di Rosa, I., Fagotti, A., Simoncelli, F., Mangiabene, C., Pipe, R. K., & Pascolini, R. (1996). Characterization and immunocytochemical localization of actin and fibronectin in haemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *The Histochemical Journal*, 28, 123-131.
- Panebianco, A., Rey-Campos, M., Romero, A., Diz, A. P., Novoa, B., & Figueras, A. (2023). *Mytilus galloprovincialis* releases immunologically functional haemocytes to the intervalvar space in response to tissue injury and infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 138, 108806.
- Parichy, D. M. (2015). Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *Elife*, 4, e05635.
- Parisi, M. G., Pirrera, J., La Corte, C., Dara, M., Parrinello, D., & Cammarata, M. (2021). Effects of organic mercury on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and morphology. *Journal of Comparative Physiology B*, 191, 143-158.
- Patetsini, E., Dimitriadis, V. K., & Kaloyianni, M. (2013). Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. *Aquatic Toxicology*, 126, 338-345.
- Paul, T., Kumar, S., Shukla, S. P., Pal, P., Kumar, K., Poojary, N., Biswal, A., & Mishra, A. (2020). A multi-biomarker approach using integrated biomarker response to assess the effect of pH on triclosan toxicity in *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878). *Environmental Pollution*, 260, 114001.

Pegoraro, C. N., Harner, T., Su, K., & Ahrens, L. (2020). Occurrence and Gas-Particle Partitioning of Organic UV-Filters in Urban Air. *Environmental Science & Technology*, 54(20), 12881-12889.

Persistence Market Research, 2020. Global Market Study on Natural & Organic Personal Care Products: Targeting the Paradigm Shift to Sub-zero Waste. Accessed on 25th May 2020 at. <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/natural-organic-personal-care-product-market.asp>.

Petranka, J. W., & Murray, S. S. (2001). Effectiveness of removal sampling for determining salamander density and biomass: a case study in an Appalachian streamside community. *Journal of Herpetology*, 36-44.

Pietsch, C., Kersten, S., Valenta, H., Dänicke, S., Schulz, C., Burkhardt-Holm, P., & Junge, R. (2015). Effects of dietary exposure to zearalenone (ZEN) on carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxins*, 7(9), 3465-3480.

Piwowarska, D., & Kiedrzyńska, E. (2022). Xenobiotics as a contemporary threat to surface waters. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 22(2), 337-354.

Png-Gonzalez, L., Aguilo-Arce, J., Vázquez-Luis, M., & Carbonell, A. (2021). New occurrence of *Pinctada imbricata radiata* (Leach, 1814) in the Balearic Archipelago (NW Mediterranean Sea). *Centro Oceanográfico de Baleares*.

Poli, A., & Fabbri, E., 2018. Fisiologia degli organismi marini, II Edizione. EdiSES s.r.l., Napoli.

Porter, A. W., Wolfson, S. J., Häggblom, M., & Young, L. Y. (2020). Microbial transformation of widely used pharmaceutical and personal care product compounds. *F1000Research*, 9.

Porretti, M., Impellitteri, F., Caferro, A., Albergamo, A., Litrenta, F., Filice, M., Imbrogno, S., Di Bella, G., Faggio, C., (2023). Assessment of the effects of non-phthalate plasticizer DEHT on the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 336, 139273.

Priya, A. K., Gnanasekaran, L., Rajendran, S., Qin, J., & Vasseghian, Y. (2022). Occurrences and removal of pharmaceutical and personal care products from aquatic systems using advanced treatment-A review. *Environmental Research*, 204, 112298.

Product Bulletin: Sodium Lauryl Sulfate. Stepan Company, Northfield, Illinois; 2012. <https://www.stepan.com/content/dam/stepan-dot-com/webdam/website-product-documents/product-bulletins/surfactants/STEPANOLWAEXTRA.pdf>.

Pulidindi, K., & Bhalerao, S. (2021). Sodium lauryl sulfate market size, share and industry analysis report by product (liquid, dry [powder, nees, granules]) and application (dish washing liquids, household detergents & cleaners, industrial cleaners, personal care products), regional outlook, growth potential, competitive landscape & forecast, 2021–2027. Report ID: GMI1396 <https://www.gminsights.com/industry-analysis/sodium-lauryl-sulfate-SLS-market>.

Puri, M., Gandhi, K., & Kumar, M. S. (2023). Emerging environmental contaminants: A global perspective on policies and regulations. *Journal of Environmental Management*, 332, 117344.

Qian, Y., He, Y., Li, H., Yi, M., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, L., Liu, L., & Lu, Z. (2022). Benzalkonium chlorides (C12) inhibits growth but motivates microcystins release of *Microcystis aeruginosa* revealed by morphological, physiological, and iTRAQ investigation. *Environmental Pollution*, 292, 118305.

Quintaneiro, C., Teixeira, B., Benedé, J. L., Chisvert, A., Soares, A. M., & Monteiro, M. S. (2019). Toxicity effects of the organic UV-filter 4-Methylbenzylidene camphor in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 218, 273-281.

- Quiroga, J. M., Sales, D., & Gomez-Parra, A. (1989). Experimental evaluation of pollution potential of anionic surfactants in the marine environment. *Water Research*, 23(7), 801-807.
- Rahman, M. M. (2015). Role of common carp (*Cyprinus carpio*) in aquaculture production systems. *Frontiers in Life Science*, 8(4), 399-410.
- Rahman, M. M., & Meyer, C. G. (2009). Effects of food type on diel behaviours of common carp *Cyprinus carpio* in simulated aquaculture pond conditions. *Journal of Fish Biology*, 74(10), 2269-2278.
- Rahman, M. M. R., Normawaty Mohammad Noor, N. M. N., Shahbudin Saad, S. S., & Kamaruzzaman Yunus, K. Y. (2016). Coastal water quality of Tioman Island: effects of human activity and the distance from shoreline, *Desalination and Water Treatment*, 57(1), 83-87.
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, 106-117.
- Regulation, E. (2008). No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. *OJ L*, 353(31.12).
- Riisgård, H. U., Lüskow, F., Pleissner, D., Lundgreen, K., & López, M. Á. P. (2013). Effect of salinity on filtration rates of mussels *Mytilus edulis* with special emphasis on dwarfed mussels from the low-saline Central Baltic Sea. *Helgoland Marine Research*, 67, 591-598.
- Riva, F., Castiglioni, S., Fattore, E., Manenti, A., Davoli, E., & Zuccato, E. (2018). Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(3), 451-457.
- Roberts, W. E., Mozsary, P. G., & Klingler, E. (1982). Nuclear size as a cell-kinetic marker for osteoblast differentiation. *American Journal of Anatomy*, 165(4), 373-384.
- Rocha, T. L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J. P., Sousa, V. S., Teixeira, M.R., & Bebianno, M. J. (2014). Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 101, 29-37.
- Rödder, D., Ihlow, F., Courant, J., Secondi, J., Herrel, A., Rebelo, R., Measey, G.J., Lillo, F., De Villiers, F.A., De Busschere, C., & Backeljau, T. (2017). Global realized niche divergence in the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Ecology and Evolution*, 7(11), 4044-4058.
- Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., & Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361-380.
- San Segundo, L., Martini, F., & Pablos, M. V. (2013). Gene expression responses for detecting sublethal effects of xenobiotics and whole effluents on a *Xenopus laevis* embryo assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9), 2018-2025.
- Santoriello, C., & Zon, L. I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2337-2343.
- Santovito, G., Trentin, E., Gobbi, I., Bisaccia, P., Tallandini, L., & Irato, P. (2021). Non-enzymatic antioxidant responses of *Mytilus galloprovincialis*: Insights into the physiological role against metal-induced oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 240, 108909.

- Satyro, S., Saggiaro, E. M., Veríssimo, F., Buss, D. F., de Paiva Magalhães, D., & Oliveira, A. (2017). Triclocarban: UV photolysis, wastewater disinfection, and ecotoxicity assessment using molecular biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 16077-16085.
- Savorelli, F., Manfra, L., Croppo, M., Tornambè, A., Palazzi, D., Canepa, S., Trentini, P.L., Cicero, A.M., & Faggio, C. (2017). Fitness evaluation of *Ruditapes philippinarum* exposed to Ni. *Biological Trace Element Research*, 177, 384-393.
- Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), (2013). Opinion on benzisothiazolinone.
- Scheele, A., Sutter, K., Karatum, O., Danley-Thomson, A. A., & Redfern, L. K. (2023). Environmental impacts of the ultraviolet filter oxybenzone. *Science of the Total Environment*, 863, 160966.
- Schlegel, A. (2016). Zebrafish models for dyslipidemia and atherosclerosis research. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 159.
- Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Doubkova, V., Marsalek, P., Prokes, M., Tichy, F., Skladana, M., Fiorino, M., Mikula, P., Vecerek, V., Faggio, C., & Svobodova, Z. (2017). Effects of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 185, 1072-1080.
- Selman, K., Wallace, R. A., Sarka, A., & Qi, X., (1993). Stages of Oocyte Development in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 218(2), 203-224.
- Shaaban, H., & Alhajri, W. (2020). Usage patterns of cosmetic and personal care products among female population in Saudi Arabia: important factors for exposure and risk assessment. *Journal of Environmental and Public Health*, 2020.
- Shahjahan, M., Khatun, M. S., Mun, M. M., Islam, S. M., Uddin, M. H., Badruzzaman, M., & Khan, S. (2020). Nuclear and cellular abnormalities of erythrocytes in response to thermal stress in common carp *Cyprinus carpio*. *Frontiers in Physiology*, 11, 543.
- Shaughnessy, C. N., Malajian, D., & Belsito, D. V. (2014). Cutaneous delayed-type hypersensitivity in patients with atopic dermatitis: reactivity to topical preservatives. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(1), 102-107.
- Shi, R. (2013). Polyethylene glycol repairs membrane damage and enhances functional recovery: a tissue engineering approach to spinal cord injury. *Neuroscience Bulletin*, 29, 460-466.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 715-748.
- Silva, D. C., Serrano, L., Oliveira, T. M., Mansano, A. S., Almeida, E. A., & Vieira, E. M. (2018). Effects of parabens on antioxidant system and oxidative damages in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 85-91.
- Silva, A. L., & Wright, S. H. (1994). Short-term cell volume regulation in *Mytilus californianus* gill. *Journal of Experimental Biology*, 194(1), 47-68.
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A. M., Vega, R. L., & Epel, D. (2004). Emerging contaminants—pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552(1-2), 101-117.
- Smith Jr, L. J. (1991). The effectiveness of sodium lauryl sulphate as a shark repellent in a laboratory test situation. *Journal of Fish Biology*, 38(1), 105-113.

- Sönmez, V. Z., Ercan, N., & Sivri, N. (2020). Investigation of possible toxic effects of personal care products on *Daphnia magna* in the Kucukcekmece Lagoon, Marmara Sea (Turkey). *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 5(4), 533-540.
- Sopjani, M., Falco, F., Impellitteri, F., Guarraasi, V., Nguyen Thi, X., Dërmaku-Sopjani, M., & Faggio, C. (2024). Flavonoids derived from medicinal plants as a COVID-19 treatment. *Phytotherapy Research*, 38(3), 1589-1609.
- Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed, Z. F., & Smith, C. (2007). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 71(1), 304-309.
- Spence, R. (2011). Zebrafish ecology and behaviour. *Zebrafish models in neurobehavioral research*, 1-46.
- Statista, 2024. Beauty & personal Care: market data & analysis. <https://www.statista.com/study/55499/beauty-and-personalcare-market-data-and-analysis/> (Accessed on 19 April 2024).
- Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandoval, M., Albano, M., Zuskova, E., Velisek, J., Matozzo, V., & Faggio, C. (2020). Acute effects of neonicotinoid insecticides on *Mytilus galloprovincialis*: A case study with the active compound thiacloprid and the commercial formulation calypso 480 SC. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 110980.
- Stoddart, M.J. (2011). *Cell Viability Assays: Introduction* in Mammalian Cell Viability. Methods in Molecular Biology, Stoddart, M. (Eds) Humana Press, New York, pp. 1-6.
- Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 188-194.
- Streftaris, N., & Zenetos, A. (2006). Alien marine species in the Mediterranean-the 100 'Worst Invasives' and their impact. *Mediterranean Marine Science*, 7(1), 87-118.
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3-B.
- Suaria, G., Avio, C. G., Mineo, A., Lattin, G. L., Magaldi, M. G., Belmonte, G., Moore, C.J., Regoli, F., & Aliani, S. (2016). The Mediterranean Plastic Soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters. *Scientific Reports*, 6(1), 37551.
- Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., & Yu, G. (2015). Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: a review. *Emerging Contaminants*, 1(1), 14-24.
- Sun, H. Q., Du, Y., Zhang, Z. Y., Jiang, W. J., Guo, Y. M., Lu, X. W., Zhang, Y.M., & Sun, L. W. (2016). Acute toxicity and ecological risk assessment of benzophenone and N, N-Diethyl-3 Methylbenzamide in personal care products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(9), 925.
- Suriyampola, P. S., Shelton, D. S., Shukla, R., Roy, T., Bhat, A., & Martins, E. P. (2016). Zebrafish social behavior in the wild. *Zebrafish*, 13(1), 1-8.
- Świacka, K., Maculewicz, J., Smolarz, K., Szaniawska, A., & Caban, M. (2019). Mytilidae as model organisms in the marine ecotoxicology of pharmaceuticals-a review. *Environmental Pollution*, 254, 113082.
- Tadjuidje, E., & Heasman, J. (2010). *Xenopus* as an experimental organism. *eLS*.
- Teodorescu, M., Bercea, M., & Morariu, S. (2018). Biomaterials of poly (vinyl alcohol) and natural polymers. *Polymer Reviews*, 58(2), 247-287.

- Theodorou, J. A., Perdikaris, C., & Spinos, E. (2019). On the occurrence of rayed pearl oyster *Pinctada imbricata radiata* (Leach, 1814) in Western Greece (Ionian Sea) and its biofouling potential. *Biharean Biologist*, 13(1), 4-7.
- Tinsley, R. C., Loumont, C., & Kobel, H. R. (1996). Geographical distribution and ecology. In *The biology of Xenopus*, Tinsley, R.C., Kobel, H.R. (Eds.), Zoological Society of London, Oxford University Press, pp. 35-59.
- Tkachenko, H., & Grudniewska, J. (2016). Evaluation of oxidative stress markers in the heart and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) exposed to the formalin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 1819-1832.
- Torre, A., Trischitta, F., Corsaro, C., Mallamace, D., & Faggio, C. (2013). Digestive cells from *Mytilus galloprovincialis* show a partial regulatory volume decrease following acute hypotonic stress through mechanisms involving inorganic ions. *Cell Biochemistry and Function*, 31(6), 489-495.
- Tresnakova, N., Famulari, S., Zicarelli, G., Impellitteri, F., Pagano, M., Presti, G., Filice, M., Caferro, A., Gulotta, E., Salvatore, G., Sandova, M., Vazzana, I., Imbrogno, S., Capillo, G., Savoca, S., Velisek, J., & Faggio, C. (2023a). Multi-characteristic toxicity of enantioselective chiral fungicide tebuconazole to a model organism Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalve: Mytilidae). *Science of the Total Environment*, 862, 160874.
- Tresnakova, N., Impellitteri, F., Famulari, S., Porretti, M., Filice, M., Caferro, A., Savoca, S., D'Iglio, C., Imrbogno, S., Albergamo, A., Vazzana, I., Stara, A., Di Bella, G., Velisek, J., & Faggio, C. (2023b). Fitness assessment of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 after exposure to herbicide metabolite propachlor ESA. *Environmental Pollution*, 331, 121878.
- Trikić, M. Z., Monk, P., Roehl, H., & Partridge, L. J., (2011). Regulation of zebrafish hatching by tetraspanin cd63. *PLoS One*, 6(5), e19683.
- Ubbels, G. A., Hara, K., Koster, C. H., & Kirschner, M. W. (1983). Evidence for a functional role of the cytoskeleton in determination of the dorsoventral axis in *Xenopus laevis* eggs. *Development*, 77(1), 15-37.
- Udayan, G., Giordano, M. E., Pagliara, P., & Lionetto, M. G. (2023). Motility of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Sensitivity to paracetamol *in vitro* exposure. *Aquatic Toxicology*, 265, 106779.
- United States Department of Agriculture, National organic Program. Technical evaluation report, in: Sodium Lauryl Sulfate, USDA., 2006. Retrieved September 25, 2020, From USDA: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/%20files/media/S%20Lauryl%20report.pdf>.
- US Bureau of Labor Statistics, 2014. Consumer Expenditures in 2012.
- Usman, M., Farooq, M., & Hanna, K. (2020). Environmental side effects of the injudicious use of antimicrobials in the era of COVID-19. *Science of the Total Environment*, 745, 141053.
- Venâncio, C., Melnic, I., Tamayo-Belda, M., Oliveira, M., Martins, M. A., & Lopes, I. (2022). Polymethylmethacrylate nanoplastics can cause developmental malformations in early life stages of *Xenopus laevis*. *Science of the Total Environment*, 806, 150491.
- Villeneuve, D. L., Jensen, K. M., Cavallin, J. E., Durhan, E. J., Garcia-Reyero, N., Kahl, M. D., Leino, R. L., Makynen, E. A., Wehmas, L. C., Perkins, E.J., & Ankley, G. T. (2017). Effects of the antimicrobial contaminant triclocarban, and co-exposure with the androgen 17 β -trenbolone, on reproductive function and ovarian transcriptome of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(1), 231-242.

- Yan, S., Liang, M., Chen, R., Hong, X., & Zha, J. (2020). Reproductive toxicity and estrogen activity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to environmentally relevant concentrations of octocrylene. *Environmental Pollution*, 261, 114104.
- Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K. H., Kwon, E. E., & Tsang, Y. F. (2017). Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment*, 596, 303-320.
- Yao, C. L., & Somero, G. N. (2013). Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: cell cycle regulation and DNA repair. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(2), 159-168.
- Ye, X., Zhou, X., Furr, J., Ahn, K. C., Hammock, B. D., Gray, E. L., & Calafat, A. M. (2011). Biomarkers of exposure to triclocarban in urine and serum. *Toxicology*, 286(1-3), 69-74.
- Yilmaz, F., & Içgen, B., (2014). Characterization of SDS-degrading *Delftia acidovorans* and in situ monitoring of its temporal succession in SDS-contaminated surface waters. *Environmental Science & Pollution Research*, 21, 7413-7424.
- Yu, S., Wages, M. R., Cai, Q., Maul, J. D., & Cobb, G. P. (2013). Lethal and sublethal effects of three insecticides on two developmental stages of *Xenopus laevis* and comparison with other amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9), 2056-2064.
- Yueh, M. F., & Tukey, R. H. (2016). Triclosan: a widespread environmental toxicant with many biological effects. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 251-272.
- Yun, H., Liang, B., Kong, D., Li, X., & Wang, A. (2020). Fate, risk and removal of triclocarban: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 387, 121944.
- Wang, Y., & Liang, W. (2021). Occurrence, toxicity, and removal methods of triclosan: a timely review. *Current Pollution Reports*, 7, 31-39.
- Wang, Y., Zhang, Y., Li, X., Sun, M., Wei, Z., Wang, Y., Gao, A., Dongyan, C., Zhao, X., & Feng, X., (2015). Exploring the effects of different types of surfactants on zebrafish embryos and larvae. *Scientific Reports*, 5(1), 10107.
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., & Kinne, R. K. (2003). Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 1-80.
- Wells, S., Nornes, S., & Lardelli, M., (2011). Transgenic zebrafish recapitulating tbx16 gene early developmental expression. *PLoS One*, 6(6), e21559.
- Wei, J., Zhou, T., Hu, Z., Li, Y., Yuan, H., Zhao, K., Zhang, H., & Liu, C. (2018). Effects of triclocarban on oxidative stress and innate immune response in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 210, 93-101.
- Westheide, W., & Rieger, R., 2011. Zoologia sistematica, filogenesi e diversità degli animali, Alessandro Minelli (Eds.). Zanichelli Editore S.p.A., Bologna.
- Xu, S., Malik, M. A., Qi, Z., Huang, B., Li, Q., & Sarkar, M. (2018). Influence of the PVA fibers and SiO₂ NPs on the structural properties of fly ash based sustainable geopolymer. *Construction and Building Materials*, 164, 238-245.
- Xu, P., Zhang, X., Wang, X., Li, J., Liu, G., Kuang, Y., Xu, J., Zheng, X., Ren, L., Wang, G., Zhang, Y., Huo, L., Zhao, Z., Dingchen, C., Lu, C., Li, C., Zhou, Y., Liu, Z., Fan, Z., Shan, G., Li, X., Wu, S., Song, L., Hou,

- G., Jiang, Y., Jeney, Z., Yu, D., Wang, L., Shao, C., Song, L., Sun, J., Ji, P., Wang, J., Li, Q., Xu, L., Sun, F., Feng, J., Wang, C., Wang, S., Wang, B., Li, Y., Zhu, Y., Xue, W., Zhao, L., Wang, J., Gu, Y., Lv, W., Wu, K., Xiao, J., Wu, J., Zhang, Z., Yu, J., & Sun, X. (2014). Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature Genetics*, 46(11), 1212-1219.
- Zenker, A., Cicero, M. R., Prestinaci, F., Bottoni, P., & Carere, M. (2014). Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*, 133, 378-387.
- Zhang, Y., Stupka, E., Henkel, C. V., Jansen, H. J., Spaink, H. P., & Verbeek, F. J. (2011). Identification of common carp innate immune genes with whole-genome sequencing and RNA-Seq data. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 8(2), 165-175.
- Zhang, Y. F., Chen, S. Y., Qu, M. J., Adeleye, A. O., & Di, Y. N. (2017). Utilization of isolated marine mussel cells as an *in vitro* model to assess xenobiotics induced genotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 44, 219-229.
- Zhao, W., Guo, Y., Lu, S., Yan, P., & Sui, Q. (2016). Recent advances in pharmaceuticals and personal care products in the surface water and sediments in China. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 10, 1-12.
- Zheng, G., Filippelli, G. M., & Salamova, A. (2020). Increased indoor exposure to commonly used disinfectants during the COVID-19 pandemic. *Environmental Science & Technology Letters*, 7(10), 760-765.
- Zhong, X., Downs, C. A., Li, Y., Zhang, Z., Li, Y., Liu, B., Gao, H., & Li, Q. (2020). Comparison of toxicological effects of oxybenzone, avobenzone, octocrylene, and octinoxate sunscreen ingredients on cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). *Science of the Total Environment*, 714, 136879.
- Zicarelli, G., Faggio, C., Blahova, J., Riesova, B., Hesova, R., Doubkova, V., Svobodova, Z., & Lakdawala, P. (2024a). Toxicity of water-soluble polymers polyethylene glycol and polyvinyl alcohol for fish and frog embryos. *Science of the Total Environment*, 933, 173154.
- Zicarelli, G., Impellitteri, F., Faggio, C., Blahova, J., Riesova, B., Hesova, R., & Lakdawala, P. (2024b). Appraisal of a synthetic preservative, Quaternium-15, effect on three model organisms: new insight on environmental risks. *Aquatic Toxicology*, 107138.
- Zicarelli, G., Impellitteri, F., Faggio, C., Blahova, J., Svobodova, Z., Hesova, R., Riesova R., Vargova, M.F., Piccione, G., Multisanti, C.R., & Lakdawala, P. (2024c). Effects of a Common Surfactant Sodium Lauryl Sulfate on Early Life Stages of Two Fish and One Amphibian Species. *Water, Air, & Soil Pollution*, 235(12), 807.
- Zicarelli, G., Multisanti, C. R., Falco, F., & Faggio, C. (2022). Evaluation of toxicity of Personal Care Products (PCPs) in freshwaters: Zebrafish as a model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 94, 103923.

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del
Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI2014IT16M2OP005)
risorse FSE REACT-EU, Azione IV.4 “Dottorati e contratti di ricerca su tematiche
dell’Innovazione” e Azione IV.5 “Dottorati su tematiche Green”



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



Università
degli Studi di
Messina