



UNIVERSITÀ DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE XXXVIII
CICLO

COORDINATORE: CHIAR.MA PROF. SSA CRISTINA
CRAVANA

CURRICULUM IN MORFOFISIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE
APPLICATE

**Risposte fisiologiche ai contaminanti ambientali emergenti negli
organismi acquatici: un approccio "One Health"**

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa Federica IMPELLITTERI

Tutor

Prof. Giuseppe PICCIONE

Co-Tutor

Prof.ssa Caterina FAGGIO

Settore Scientifico Disciplinare: MVET-01/B e BIOS/06A

Anno accademico 2024/2025

INDICE

INDICE	III
LISTA DELLE ABBREVIAZIONI	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Contaminanti emergenti e quadro One Health	5
1.2 Effetto a catena COVID-19: l'ondata pandemica di CE	10
1.3 Normative e linee guida sui CE	13
1.4 I bivalvi come indicatori della salute degli ecosistemi acquatici	16
1.5 Obiettivi e descrizione del progetto	24
2. CLASSIFICAZIONE E PROPRIETÀ DEI CONTAMINANTI EMERGENTI SELEZIONATI	27
2.1 Biocidi e conservanti	27
2.1.1. <i>Isotiazolinoni (BIT, OIT, CMIT)</i>	28
2.1.2. <i>Quaternium-15</i>	33
2.2 Tensioattivi e detergenti	37
2.2.1. <i>Laurilsolfato di sodio (SLS)</i>	38
2.2.2. <i>Alcol Polivinilico (PVA)</i>	42
2.2.3. <i>Polietilenglicole (PEG)</i>	46
2.3 Microplastiche e additivi plastici	51

2.3.1. Polietilene	52
2.3.2. Di(2-etilesil) tereftalato (DEHT)	55
2.4 Residui farmaceutici: la Clorpromazina come neuroattivo di riferimento	58
2.5 Sintesi critica e lacune conoscitive	62
3. STRATEGIE DI MITIGAZIONE: SOLUZIONI NATURALI E BIOTECNOLOGICHE	65
3.1. Estratto di Bergamotto (<i>Citrus bergamia</i>)	68
3.2. Idrolizzati proteici derivati dalla mosca soldato nera (<i>Hermetia illucens</i>)	72
3.4 Impiego di bioprodotto naturali e prospettive applicative	78
4. MATERIALI E METODI	80
4.1 Organismi modello e protocolli di stabulazione	80
4.1.1. <i>M. galloprovincialis</i> : acquisizione e condizioni di mantenimento	80
4.1.2. <i>P. imbricata</i> : acquisizione e condizioni di mantenimento	81
4.2 Preparazione delle soluzioni stock e concentrazioni sperimentali	82
4.2.1. Benzisotiazolinone (BIT)	84
4.2.2. Otile isotiazolinone (OIT)	84
4.2.3. Metilcloroisotiazolinone (CMIT) e Idrolizzati proteici da <i>Hermetia illucens</i> (BPHs)	85
4.2.4. Quaternium-15	86
4.2.5. Laurilsolfato di sodio (SLS) e olio essenziale di bergamotto (BRG)	87
4.2.6. Alcol Polivinilico (PVA)	87
4.2.7. Polietilenglicole (PEG)	88
4.2.8. Polietilene (MPs) e caffeina	89
4.2.9. Di(2-etilesil) tereftalato (DEHT)	89
4.2.10. Clorpromazina (Cpz)	91
4.3 Somministrazione di nutraceutici e bioprodotto	92

4.4 Saggi fisiologici, biochimici e molecolari _____	93
4.4.1. Vitalità cellulare _____	93
4.4.2. La fagocitosi _____	95
4.4.3. Saggio di Regolazione del Volume Cellulare (RVD) _____	96
4.4.4. Analisi istologiche e morfologiche _____	98
4.4.5. Parametri biochimici ed elettrolitici _____	100
4.4.6. Biomarker di stress ossidativo _____	101
4.4.7. Attività apoptotiche _____	103
4.4.8. Analisi del bisso _____	104
4.5 Analisi statistiche _____	105
5. RISULTATI _____	107
5.1 Esposizione al BIT _____	107
5.2. Esposizione all'OIT _____	113
5.3. Esposizione al Quaternium-15 _____	119
5.3.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> _____	119
5.3.2. <i>Pinctada imbricata</i> _____	124
5.4. Esposizione al PVA _____	128
5.5. Esposizione al PEG _____	137
5.6. Esposizione al Polietilene _____	149
5.7. Esposizione al DEHT _____	161
5.8. Esposizione alla Clorpromazina _____	165
5.9. Efficacia protettiva di nutraceutici e bioprodotto: esposizioni combinate _____	174
5.9.1. SLS ed estratto di bergamotto _____	174
5.9.2. CMIT e BPHs _____	182

6. DISCUSSIONI	187
6.1. BIT	188
6.2. OIT	190
6.3. Quaternium-15	192
6.3.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i>	192
6.3.2. <i>Pinctada imbricata</i>	194
6.4. PVA	195
6.5. PEG	198
6.6. Polietilene (MP)	200
6.7. DEHT	202
6.8. Clorpromazina	204
6.9. SLS ed estratto di Bergamotto	206
6.10. CMIT e BPHs	208
6.11. Espansione delle analisi a ulteriori contaminanti emergenti o ad organismi alternativi	209
CONCLUSIONI	211
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	214

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

- ADWG – Australian Drinking Water Guidelines
- BPHs – Black soldier fly Protein Hydrolysates (idrolizzati proteici da *Hermetia illucens*)
- BIT – Benzisothiazolinone
- BRG – Estratto di bergamotto (*Citrus bergamia*)
- CE – Contaminanti emergenti
- CMIT – Metilcloroisotiazolinone
- Cpz – Clorpromazina
- DEHT – Di(2-etilesil) tereftalato
- EPA – Environmental Protection Agency
- MP / MPs – Microplastiche
- OIT – Ottil isotiazolinone
- PEG – Polietilenglicole
- PE – Polietilene
- PPCP – Pharmaceuticals and Personal Care Products
- PVA – Alcol polivinilico
- QACs – Quaternary Ammonium Compounds
- RVD – Regulatory Volume Decrease
- ROCs – Reverse Osmosis Concentrates
- SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
- SLS – Laurilsolfato di sodio
- WWTPs – Wastewater Treatment Plants

ABSTRACT

La crescente diffusione di contaminanti emergenti (CE) negli ecosistemi acquatici rappresenta una minaccia significativa per la biodiversità e la salute pubblica, richiedendo un approccio integrato secondo il paradigma "One Health". La presente tesi di dottorato ha avuto un duplice obiettivo: in primo luogo, caratterizzare gli effetti fisiologici ed ecotossicologici di una vasta gamma di CE, includendo biocidi (BIT, OIT, CMIT, Quaternium-15), tensioattivi e polimeri (SLS, PVA, PEG), microplastiche, additivi (PE, DEHT) e residui farmaceutici (clorpromazina), utilizzando i bivalvi marini *Mytilus galloprovincialis* e *Pinctada imbricata* come organismi sentinella. In secondo luogo, valutare il potenziale di bioprodotto di origine naturale, quali l'estratto di Bergamotto (*Citrus bergamia*) e gli idrolizzati proteici da *Hermetia illucens* (BPHs), come agenti di mitigazione del danno indotto.

È stato adottato un approccio multilivello, analizzando una batteria di biomarker a livello cellulare, biochimico, fisiologico e istologico, tra cui la vitalità cellulare, la risposta immunitaria (fagocitosi), la regolazione del volume cellulare (RVD), lo stress ossidativo, l'apoptosi, le alterazioni tissutali e la produzione del bisso.

I risultati hanno dimostrato che tutti i contaminanti testati inducono risposte avverse, sebbene con specificità legate alla natura chimica del composto e al tessuto target. Tra gli effetti comuni più rilevanti sono emersi la compromissione dell'integrità di membrana, l'immunosoppressione (evidenziata dalla ridotta capacità fagocitaria degli emociti circolanti), l'alterazione dell'omeostasi cellulare (incapacità di regolare il volume

cellulare) e l'induzione di stress ossidativo. Le analisi istologiche hanno confermato il danno a livello tissutale, in particolare a carico di branchie e ghiandola digestiva.

Di fondamentale importanza, gli esperimenti di mitigazione hanno rivelato che l'estratto di bergamotto e gli idrolizzati proteici da *H. illucens* possiedono una significativa capacità protettiva, riuscendo a contrastare il danno cellulare e fisiologico indotto rispettivamente da SLS e CMIT.

Nel suo complesso, questo lavoro fornisce un contributo duplice: da un lato, caratterizza con un approccio multi-biomarker i meccanismi di danno indotti da un vasto pannello di contaminanti emergenti; dall'altro, offre una prova di concetto sull'efficacia di bioprodotti naturali nel mitigare tale danno. Questi risultati non solo ampliano le conoscenze ecotossicologiche, ma inseriscono la valutazione del rischio ambientale in una prospettiva applicativa e sostenibile, in piena coerenza con i principi del quadro "One Health".

1. INTRODUZIONE

1.1 Contaminanti emergenti e quadro One Health

Negli ultimi vent'anni la comunità scientifica ha iniziato a riconoscere un'ampia gamma di molecole antropogeniche come "contaminanti emergenti" (CE). Queste sostanze, a lungo ignorate dai programmi di monitoraggio convenzionali a causa dei limiti analitici dell'epoca, vengono ora rilevate regolarmente in quasi tutti i comparti ambientali grazie ai progressi strumentali. Come notano Sauvé e Desrosiers (2014), la consapevolezza riguardo ai contaminanti ambientali può essere ricondotta al libro di Rachel Carson del 1962 "Silent Spring," che per primo mise in evidenza le conseguenze ecologiche del DDT, un prodotto chimico sintetizzato decenni prima ma i cui impatti ambientali rimasero a lungo sconosciuti.

Il termine "contaminanti emergenti" include una vasta gamma di sostanze: farmaci e prodotti per la cura personale (PPCP), additivi industriali come plastificanti e ritardanti di fiamma, pesticidi, nanomateriali ingegnerizzati, geni di resistenza agli antibiotici e un elenco in crescita di nuove sostanze, tra cui edulcoranti artificiali, silossani, muschi sintetici e persino antimonio rilasciato dalle bottiglie in PET (Richardson & Kimura, 2019). Sebbene presenti a concentrazioni generalmente nell'ordine dei nano- o microgrammi per litro, questi composti destano preoccupazione a causa della tossicità cronica, dell'attività endocrina, della promozione della resistenza agli antibiotici e,

soprattutto, del loro rilascio continuo, fenomeno spesso descritto come "pseudo-persistenza" (Taheran et al., 2018).

È importante riconoscere che "emergenti" è un termine relativo che può riferirsi a tre scenari distinti: composti davvero nuovi apparsi di recente, composti noti il cui significato ambientale è stato riconosciuto solo recentemente e nuove conoscenze sui contaminanti tradizionali che ridefiniscono la comprensione dei loro rischi (Sauvé & Desrosiers, 2014). Questa distinzione aiuta a spiegare perché l'attenzione scientifica e regolatoria si sposta continuamente dai PCB ai ritardanti di fiamma polibromurati fino ai loro più recenti sostituti, ciascuna ondata rappresentando una diversa fase nel ciclo di "emersione".

La maggior parte dei CE entra nelle acque superficiali attraverso gli impianti di trattamento delle acque reflue municipali e industriali. I processi convenzionali a fanghi attivi sono stati progettati per ridurre la domanda di ossigeno e i patogeni, non per rimuovere composti organici altamente solubili o polari presenti a livelli di traccia; di conseguenza, molti PPCP, filtri UV o biocidi attraversano la barriera di trattamento sostanzialmente inalterati (Noguera-Oviedo & Aga, 2016). Gli effluenti scaricati nei fiumi e nelle aree costiere diventano fonti secondarie per sedimenti, acque sotterranee e, in ultima analisi, biota marino. I biosolidi generati dagli impianti di trattamento delle acque reflue possono concentrare CE idrofobici come ritardanti di fiamma bromurati, triclosan o analoghi del bisfenolo, consentendo ridistribuzioni nel suolo quando questi fanghi sono applicati come fertilizzanti (Taheran et al., 2018).

La sfida analitica posta dai CE non è banale. Solo l'avvento della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione, alle piattaforme oa-TOF, Q-TOF e Orbitrap, ha reso possibile il rilevamento routinario di molecole molto polari e

altamente solubili in acqua (Noguera-Oviedo & Aga, 2016). Ancora oggi, quantificare i CE in matrici complesse come fanghi, biofilm, o colloidali marini rimane difficile, e molti prodotti di trasformazione o degradazione sfuggono ai flussi di lavoro delle analisi target convenzionali (Richardson & Kimura, 2019). Queste limitazioni si traducono in lacune conoscitive riguardo alla presenza, al destino e alla tossicità delle miscele.

Esempi contemporanei illustrano la diversità dei problemi legati ai contaminanti emergenti. I pesticidi neonicotinoidi, sebbene utilizzati in quantità minori rispetto ai loro predecessori, sollevano preoccupazioni sul collasso delle colonie di api e sugli effetti sugli insetti non bersaglio (Sauvé & Desrosiers, 2014). Le cianotossine, prodotte da alcuni degli organismi più antichi della Terra, stanno diventando più diffuse a causa dell'eutrofizzazione e dei cambiamenti climatici, con molte varianti ancora non identificate e non monitorate. Le nanoparticelle prodotte sfidano i paradigmi tradizionali di valutazione del rischio perché il loro comportamento sfugge ai metodi di filtrazione convenzionali, e la loro tossicità può dipendere sia dalle proprietà particellari sia dalle dinamiche di dissoluzione (Sauvé & Desrosiers, 2014). I sottoprodotti del trattamento rappresentano un'altra categoria di composti formati durante il trattamento delle acque o delle acque reflue quando i reagenti reagiscono in modo incompleto con i contaminanti target o i componenti della matrice, creando nuove sostanze con potenziale tossicità

Per inquadrare correttamente i contaminanti emergenti, è utile chiarire cosa significhi veramente "One Health". L'espressione deriva da oltre un secolo di pensiero medico comparativo: dalla definizione di "zoonosi" di Virchow, alla proposta di Osler di un curriculum medico comune per medici e veterinari, fino al rilancio negli anni '70 di Schwabe della "One Medicine" nelle comunità pastorali africane. Tuttavia, nel tempo, il concetto si è ampliato fino a includere interi ecosistemi (Zinsstag et al., 2005).

Il punto di svolta si è verificato nei primi anni 2000: l'epidemia di SARS, la diffusione dell'influenza aviaria H5N1 e i "Manhattan Principles" del 2004 emessi dalla Wildlife Conservation Society hanno evidenziato che la salute umana, animale e ambientale è inseparabile in un'epoca di commercio globale, agricoltura intensiva e rapidi cambiamenti nell'uso del suolo (FAO/WHO/OIE, 2008; Osofsky et al., 2005).

Oggi, One Health è comunemente definito come un approccio transdisciplinare e multisetoriale volto a "ottenere risultati ottimali di salute attraverso il riconoscimento dell'interconnessione tra persone, animali, piante e il loro ambiente condiviso" (Adisasmito et al., 2022). In termini pratici, l'implementazione si basa sulle "4 C": comunicazione, coordinamento, collaborazione e costruzione di capacità tra settori che tradizionalmente lavoravano in isolamento. I principi fondamentali includono equità, inclusività, gestione delle risorse naturali e una visione socio-ecologica delle malattie e dei percorsi di esposizione.

Perché questo è importante per le sostanze chimiche? Gli stessi fattori che favoriscono la diffusione zoonotica (urbanizzazione, intensificazione della zootecnia, invasione degli ecosistemi) accelerano anche il rilascio di farmaci, biocidi, plastificanti e altri contaminanti emergenti. Gli effluenti delle acque reflue collegano ospedali ai fiumi; il letame degli animali trasporta farmaci veterinari ai campi coltivati e alle popolazioni di insetti; le catene di approvvigionamento globali disperdono ritardanti di fiamma e sostanze perfluoroalchiliche ben oltre i punti di produzione. L'esposizione cronica a basso livello si verifica quindi nella fauna selvatica, negli animali da cibo e nelle comunità umane, mentre gli agenti antimicrobici contribuiscono a un serbatoio comune di geni di resistenza (Noguera-Oviedo & Aga 2016). Affrontare tali rischi convergenti è impossibile all'interno di una singola disciplina: la regolamentazione chimica senza sorveglianza veterinaria, o la tossicologia clinica senza monitoraggio ambientale,

affronteranno solo frammenti del problema. Una vera strategia One Health per i contaminanti emergenti deve integrare il controllo delle fonti, trattamenti avanzati, monitoraggio ecologico e protezione della salute pubblica sotto un unico ombrello.

Da una prospettiva One Health, la salvaguardia integrata della salute ambientale, animale e umana mostra come i CE rappresentino un rischio convergente. L'esposizione cronica degli organismi acquatici è stata collegata a disturbi riproduttivi, immunomodulazione e alterazioni comportamentali, mentre l'esposizione umana può avvenire indirettamente tramite acqua potabile o prodotti ittici.

Le risposte normative sono ancora agli inizi. Sebbene l'Unione Europea abbia emesso liste di controllo e la Svizzera e il Canada abbiano sperimentato aggiornamenti degli impianti di trattamento delle acque reflue per la rimozione dei CE, la maggior parte delle giurisdizioni manca di standard vincolanti (Taheran et al., 2018). Come sottolineano Sauv e e Desrosiers (2014), questo pone una sfida per le agenzie regolatorie: come stabilire priorit  di ricerca e criteri di qualit  per sostanze sulle quali abbiamo conoscenze limitate? Il divario tra l'identificazione scientifica dei rischi e l'azione regolatoria pu  essere sostanziale, come dimostrano le restrizioni gradualistiche su vari ritardanti di fiamma nel corso dei decenni.

Nel complesso, i contaminanti emergenti rappresentano un bersaglio mobile. Variano da additivi industriali di lunga data a nuove molecole, ma condividono la capacit  di sfuggire ai monitoraggi e ai trattamenti convenzionali. Se una sostanza diventa prioritaria dipende da quanto spesso viene rilevata, dalla sua persistenza e dalla sua azione subdola a basse concentrazioni. Le tecniche analitiche e le tecnologie di rimozione stanno ancora rincorrendo; un vero progresso richieder  non solo reattori e filtri pi  intelligenti, ma anche misure che limitino i rilasci alla fonte. E qualunque strategia si

adotti, deve essere inquadrata nella prospettiva One Health, perché le sostanze chimiche che disturbano le comunità microbiche o faunistiche acquatiche possono alla fine tornare a influenzare il bestiame, le colture e, in ultima analisi, il benessere umano.

1.2 Effetto a catena COVID-19: l'ondata pandemica di CE

La pandemia di COVID-19 ha avuto un impatto significativo sulle dinamiche dei contaminanti emergenti, aumentandone la presenza negli ecosistemi acquatici e mettendo alla prova i quadri gestionali ambientali esistenti (Figura 1). Questo evento globale senza precedenti ha influenzato varie classi di CE, richiedendo un esame approfondito delle sue implicazioni ambientali (Mohamed et al., 2022).

- **Biocidi:** Prima della pandemia, solo il 35% delle persone praticava regolarmente la disinfezione delle mani. Tuttavia, questo comportamento è cambiato drasticamente, con il 91% delle persone che si disinfettavano almeno due volte al giorno durante il COVID-19. Ciò ha portato a un aumento significativo di biocidi, come composti di ammonio quaternario, agenti a base di cloro e isopropanolo nelle acque (Han et al., 2024; Pacheco et al., 2021). L'uso intensificato di questi disinfettanti ha contribuito non solo all'inquinamento diretto, ma ha anche evidenziato la necessità di migliorare i sistemi di trattamento delle acque reflue per gestire tali picchi improvvisi.
- **Farmaci e Prodotti per la Cura Personale (PPCP):** Nonostante meno del 10% dei pazienti avesse bisogno di antibiotici per il COVID-19, si stima che il 75% li abbia ricevuti tramite prescrizione o automedicazione, contribuendo a un sovraccarico ambientale significativo (Langford et al., 2021). Questo uso eccessivo ha provocato un aumento drammatico, in particolare di sulfametoxazolo e

claritromicina, con concentrazioni aumentate di oltre il 49.000% (de Andrade et al., 2024). Inoltre, analgesici e antinfiammatori, utilizzati ampiamente per la gestione dei sintomi, hanno visto la loro presenza nelle acque reflue crescere del 173% (de Andrade et al., 2024). Tali dati evidenziano come la pandemia abbia alterato le modalità di utilizzo dei farmaci, sottolineando la complessità della gestione dei CE.

- **Dispositivi di Protezione Individuale (DPI):** La domanda di DPI durante la pandemia, prevalentemente composti da plastiche come polipropilene e polietilene, ha generato sfide ambientali. Lo smaltimento inappropriato ha trasformato questi materiali in una fonte significativa di microplastiche. Questi materiali, frammentati in microplastiche, sono stati ampiamente rilevati in ambienti costieri e marini, ponendo nuovi rischi ecologici poiché fungono da vettori per inquinanti organici idrofobici e metalli pesanti, complicando ulteriormente la salute di questi ecosistemi (Han et al., 2024; Prado et al., 2020). Studi bibliometrici hanno mostrato un aumento delle pubblicazioni di ricerca su questa nuova fonte di inquinamento, evidenziandone l'importanza e la natura persistente.
- **Distruttori Endocrini:** Nell'era pandemica, si è registrato un aumento delle concentrazioni di distruttori endocrini come il bisfenolo A e il triclosan del 40%, in particolare nel contesto delle acque reflue in Italia e Spagna. Questi aumenti sono attribuiti al consumo incrementato e a metodi di smaltimento inadeguati, che accentuano le sfide duali dell'aumento dell'uso di plastiche e dell'inquinamento chimico nelle strategie di risposta alla pandemia (de Andrade et al., 2024).

In questo contesto, è cruciale osservare che gli impianti di trattamento delle acque reflue tradizionali non erano adeguatamente preparati per affrontare i maggiori carichi di contaminanti. L'efficienza di rimozione del sulfametoxazolo, ad esempio, è diminuita in modo significativo, passando dal 25% al 12% durante la pandemia (de Andrade et al., 2024). Questa inefficacia evidenzia l'urgente necessità di sviluppare tecnologie di trattamento avanzate in grado di gestire alti livelli di contaminanti durante eventi globali di tale portata. Parallelamente, le tecnologie analitiche avanzate, come la spettrometria di massa ad alta risoluzione e l'intelligenza artificiale, hanno svolto un ruolo chiave nell'ampliare la nostra comprensione di questi contaminanti. Questi strumenti consentono di rilevare nuovi prodotti di trasformazione e nanoparticelle ingegnerizzate, come TiO_2 e SiO_2 , che precedentemente sfuggivano ai monitoraggi standard (de Andrade et al., 2024). Tale progresso tecnologico sottolinea la necessità di miglioramenti metodologici continui nel monitoraggio ambientale.

ANTIBIOTICS		ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY		ENDOCRINE DISRUPTORS		LIPID REGULATOR	
SMX	+ 99,900%	IBU	+ 5,436%	BPA	+ 20,400%	-	-
CLA	+ 49,470%	NPX	+ 2,770%	TSC	+ 380%	-	-
ERY	- 93%	MEF	- 75%	TCC	- 90%	GEM	- 51%
LEV	- 96%	TRA	- 34%	-	-	-	-
(2018 - 2019)	(2020 - 2022)	(2018 - 2019)	(2020 - 2022)	(2018 - 2019)	(2020 - 2022)	(2018 - 2019)	(2020 - 2022)
Spain; Italy; Holland and China	Canada; Spain; South Africa; Cyprus and China	Spain and Colombia	Spain; Germany; Malaysia and France	France and Canada	Italy and Spain	Spain	Costa Rica and France
REMOVAL EFFICIENCIES 95% - CLA and 89% - ERY treated with Ultrafiltration (UF) and Granular Activated Carbon		REMOVAL EFFICIENCIES 89.8% ~ 100% - IBU treated with photo-assisted POA		REMOVAL EFFICIENCIES 81% - TSC treated with Integrated Constructed Wetland System (ICW)		REMOVAL EFFICIENCIES 66% - GEM treated with advanced process of bio-oxidation with mold <i>Trametes versicolor</i> immobilized in	
ESTROGENS		ANTIPILEPTIC AND ANTIPSYCHOTIC DRUGS		PESTICIDES		PSYCHOACTIVE DRUGS	
E1	+ 79,233%	DIA	+ 2,999,900%	ATR	+ 11,900%	CAF	+ 157%
E2	+ 31,775%	CBZ	+ 1,330%	DDVP	+ 200%	-	-
EE2	+ 13,400%	OXA	+ 115%	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
(2018 - 2019)	(2020 - 2022)	(2018 - 2019)	(2020 - 2022)	(2018 - 2019)	(2020 - 2022)	(2018 - 2019)	(2020 - 2022)
China	Spain; Serbia and Mexico	Spain	Serbia; France; Spain; Greece and Colombia	China	China	China; Spain and Pakistan	Canada; Brazil; South Africa and China
REMOVAL EFFICIENCIES 92% - E1, 92% - E2 and 93% - EE2 treated with Ultrafiltration System in Urban Wastewater Treatment		REMOVAL EFFICIENCIES 86% - CBZ treated with Constructed Horizontal Subsurface Flow Wetlands		REMOVAL EFFICIENCIES 96% - ATR and 94% - DDVP treated with Integrated Constructed Wetland System (ICW)		REMOVAL EFFICIENCIES 98.7% - CAF treated with Wastewater Treatment Plant (WWTPs)	

Figura 1: Illustrazione delle fluttuazioni nell'identificazione e nella quantificazione dei contaminanti emergenti nelle acque reflue in vari Paesi prima e durante la pandemia COVID-19 (de Andrade et al., 2024).

1.3 Normative e linee guida sui CE

Le crescenti evidenze sugli effetti ecotossicologici e per la salute umana hanno spinto molte nazioni industrializzate a definire normative per i contaminanti emergenti. Sebbene l'ampiezza, gli strumenti legali e la velocità di attuazione varino tra le diverse giurisdizioni, tutti i quadri normativi attuali si fondano su tre pilastri: (i) monitoraggio sistematico delle sostanze chimiche precedentemente non regolamentate, (ii) priorità basata sul rischio con particolare attenzione alle sostanze endocrine-attive e persistenti, e (iii) aggiornamento iterativo degli standard in linea con i progressi scientifici. L'analisi seguente sintetizza le principali strutture regolatorie adottate da cinque Paesi di riferimento: Stati Uniti, Unione Europea, Giappone, Australia e Canada, evidenziando statuti, programmi consultivi e limiti specifici ai prodotti che, collettivamente, plasmano la risposta globale ai CE:

- **Stati Uniti:** Il programma dell'Unregulated Contaminant Monitoring del Safe Drinking Water Act gioca un ruolo centrale nell'identificare e aggiornare la lista dei contaminanti basata sugli effetti sulla salute e sulla prevalenza nei sistemi idrici (Ramírez-Malule et al., 2020). L'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (EPA) richiede la selezione e regolazione dei composti che alterano il sistema endocrino, monitorati durante la produzione e trasformazione per proteggere le riserve alimentari e idriche (USEPA, 2014). Inoltre, il Toxic Substances Control Act (TSCA) e la Food and Drug Administration (FDA)

forniscono supervisione regolatoria per garantire la conformità agli standard di sicurezza.

- **Unione Europea:** L'UE ha adottato misure legislative proattive per affrontare i CE, come la Direttiva Quadro sulle Acque, che stabilisce linee guida per l'acqua potabile sicura in tutta Europa. L'istituzione del regolamento REACH (Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals) è stata fondamentale nella gestione delle sostanze chimiche. REACH identifica le sostanze di forte preoccupazione, inclusi gli interferenti endocrini, e ne limita l'uso fino a quando non sono disponibili alternative più sicure (Barbosa et al., 2016). Inoltre, gli standard di qualità ambientale impongono limiti sui contaminanti nei prodotti cosmetici e nelle acque superficiali, promuovendo misure preventive in vari settori.
- **Giappone:** Le linee guida del Giappone ruotano attorno agli Standard di Qualità dell'Acqua Potabile, che si sono evoluti per includere sostanze chimiche pericolose sulla base di valutazioni scientifiche in corso (Johnson et al., 2013). Il Ministero dell'Ambiente lavora per rivedere continuamente questi standard, tenendo conto delle più recenti valutazioni di rischio per la salute, dei tassi di rilevamento e dei progressi tecnologici nei processi di trattamento. Questo assicura che la salute pubblica sia tutelata contro sostanze potenzialmente nocive.
- **Australia:** Le Linee Guida per l'Acqua Potabile Australiana (ADWG) fanno parte della Strategia Nazionale di Gestione della Qualità dell'Acqua, mirata a proteggere e migliorare la qualità dell'acqua bilanciando la crescita economica (NHMRC, 2017). Inoltre, politiche come l'Environment Protection (Water) Policy del 2009 regolano la presenza di CE nell'ambiente acquatico, garantendo resilienza contro le minacce emergenti. Il Cooperative Research Centre for

Contamination Assessment and Remediation of the Environment (CRC CARE) collabora con enti governativi per sviluppare linee guida efficaci sui CE.

- **Canada:** Sotto il Canadian Environmental Protection Act (CEPA), misure comprensive mirano a prevenire l'inquinamento e promuovere lo sviluppo sostenibile. L'atto include regolamenti specifici per la gestione dei rifiuti pericolosi e il controllo delle sostanze chimiche, affrontando CE come i farmaci e gli idrocarburi policiclici aromatici. L'approccio del Canada si concentra sull'equilibrio tra protezione ambientale e preoccupazioni per la salute umana attraverso regolamentazione basata su evidenze e gestione del rischio.

Nel complesso, questi quadri normativi nazionali delineano una risposta progressivamente coordinata al problema dei Contaminanti Emergenti, che sottolinea il monitoraggio continuo, la revisione periodica degli standard e l'adozione di nuove tecnologie analitiche. Tuttavia, le norme scritte da sole non possono garantire la sicurezza ambientale; il loro successo dipende in ultima analisi dai dati affidabili sul campo che rivelano come, dove e in che misura i contaminanti si accumulano. Identificare indicatori biologici robusti è quindi il prossimo passo logico. Negli ambienti acquatici, i bivalvi filtratori si sono dimostrati particolarmente preziosi a questo scopo, fornendo un segnale integrato dell'esposizione chimica nel tempo e nello spazio. La sezione successiva esplora il loro ruolo come sentinelle della salute acquatica e illustra perché siano centrali in una moderna strategia di sorveglianza One Health.

1.4 I bivalvi come indicatori della salute degli ecosistemi acquatici

Il costante aumento dei contaminanti emergenti nelle acque di superficie - dalle nanoparticelle metalliche ai residui farmaceutici entrati in circolazione con la pandemia COVID-19 - ha evidenziato i limiti del monitoraggio basato esclusivamente su sensori fisico-chimici e su liste di sostanze “prioritarie”. Nel paradigma One Health, che riconosce l'interconnessione tra salute umana, animale ed ecosistemica, diventa imperativo disporre di indicatori biologici in grado di integrare gli effetti sinergici di miscele complesse e di segnalare precocemente condizioni di rischio anche quando i valori di concentrazione rimangono al di sotto degli attuali limiti normativi. Infatti, le recenti linee guida europee e internazionali sui CE raccomandano l'uso complementare di biotest e bioindicatori per supportare la valutazione dell'impatto e l'adozione di misure di mitigazione. In questo contesto, i molluschi bivalvi offrono una piattaforma di sorveglianza particolarmente efficace: la loro ecologia di filtrazione, la tendenza al bioaccumulo e la distribuzione cosmopolita consentono di trasformare ogni individuo in un “campionatore vivente” che integra nel tempo i segnali chimici, fisici e biologici dell'ambiente circostante. In questa sezione vengono quindi presentate le caratteristiche tassonomiche, biogeografiche (Figura 2) e anatomiche (Figura 3, Figura 4) delle specie di maggiore interesse (con particolare riguardo a *Mytilus galloprovincialis*) e vengono poi discussi i principali parametri comportamentali e fisiologici utilizzati nei sistemi di allerta biologica progettati per proteggere la qualità delle acque.

Nel campo del biomonitoraggio gli organismi più impiegati appartengono ai generi *Mytilus*, tipici delle acque costiere marine. *M. galloprovincialis* forma popolazioni dense lungo l'intero bacino mediterraneo e sulle coste atlantiche temperato-calde; la congenerica *Mytilus edulis* occupa prevalentemente le fasce boreali dell'Atlantico

settentrionale. A queste due specie si affiancano *Mytilus trossulus*, distribuita nelle acque più fredde del Pacifico settentrionale (dalla California alla Kamčatka), del Mare di Bering, del Mar Artico e del Baltico, con zone di sovrapposizione e ibridazione con *M. edulis* lungo le coste canadesi e scozzesi (Eggermont et al., 2017). La presenza pressoché continua di queste tre specie lungo ampi gradienti geografici e climatici consente di utilizzare lo stesso modello biologico in reti di sorveglianza interconfrontabili, dal Mediterraneo fino ai mari subartici, coprendo così un'ampia varietà di pressioni antropiche.

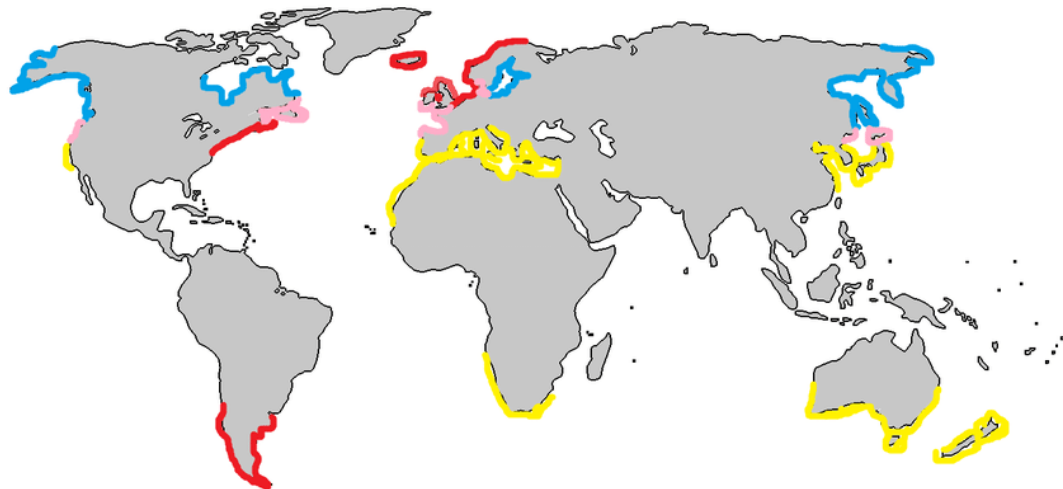


Figura 2: Zone di presenza naturale di *M. edulis* (rosso), *M. galloprovincialis* (giallo) e *Mytilus trossulus* (blu) e le loro zone ibride (rosa).

Per comprendere appieno il ruolo dei mitili come bioindicatori, è essenziale esplorare la loro anatomia, che riflette un adattamento ottimale alla vita in ambienti acquatici e supporta la loro capacità di filtrazione e bioaccumulo. e mantenendo le citazioni originali per garantire accuratezza e rispetto delle fonti.

La conchiglia costituisce l'elemento strutturale fondamentale di un bivalve come *Mytilus*. Essa è formata da due valve simmetriche che si uniscono nella regione

dorsale dell'animale. In questa zona, è presente una protuberanza chiamata umbone, che rappresenta la porzione più antica della conchiglia, da cui si sviluppano linee concentriche di accrescimento, testimonianza della crescita progressiva dell'organismo (Castro & Huber, 2011). Le valve sono collegate nella parte dorso-mediana attraverso un sistema di articolazione noto come cerniera, composto da fossette e dentelli che ne impediscono lo scivolamento reciproco. Esistono diversi tipi di cerniera in base alla specie di bivalve, tra cui taxodonte, schizodonte, disodonte, isodonte, eterodonte, pachidonte e desmodonte, ciascuno caratterizzato da un numero e una disposizione variabile di dentelli; in alcuni casi, tuttavia, la cerniera può essere priva di queste strutture (Westheide & Rieger, 2011). Le valve sono mantenute chiuse grazie all'azione dei muscoli adduttori, che attraversano trasversalmente la conchiglia. Tuttavia, in specie come *M. galloprovincialis*, si osserva una regressione di uno di questi muscoli, il che influisce sulla forza di chiusura della conchiglia (Castro & Huber, 2011). Il piede, un organo muscolare tipico dei molluschi, assume nei mitili una funzione di ancoraggio, agendo come una ventosa o uno strumento per scavare. Al suo interno si trovano diverse ghiandole, tra cui spicca la ghiandola bissale, capace di produrre filamenti proteici noti come bisso. Questi filamenti permettono ai mitili di ancorarsi saldamente a substrati solidi come rocce o ad altri individui della stessa specie, un adattamento fondamentale per la loro sopravvivenza in ambienti marini turbolenti (Castro & Huber, 2011).

La conchiglia è secreta dal mantello, una struttura epiteliale che riveste completamente la cavità interna dell'animale, proteggendo il corpo molle in un'area definita cavità del mantello o cavità palleale (Castro & Huber, 2011). Il mantello si compone di tre pliche distinte: una interna, una mediana, che ospita principalmente gli organi di senso, e una esterna, responsabile della secrezione della conchiglia stessa (Westheide & Rieger, 2011). Subito al di sotto del mantello si trovano le branchie, strutture a pettine denominate

ctenidi, che svolgono un ruolo cruciale nella respirazione e nell'alimentazione (Poli & Fabbri, 2018). Nelle specie di *Mytilus*, le branchie sono cigliate e filamentose, organizzate in lamelle che si estendono dorsalmente lungo la parete corporea e quella del mantello. I filamenti adiacenti possono essere uniti da gruppi di ciglia disposti sagittalmente, formando una sorta di pseudo-lamina; nei bivalvi più evoluti, come alcuni mitili, si sviluppano vere e proprie branchie lamellari (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011). Il movimento ritmico delle ciglia genera un flusso unidirezionale di acqua attraverso le branchie, permettendo sia lo scambio gassoso sia la raccolta di particelle alimentari (Poli & Fabbri, 2018).

Passando al sistema nervoso, i bivalvi come *Mytilus* presentano una struttura semplice composta da tre paia di gangli principali, che funzionano in modo autonomo. Gli organi sensoriali includono le statocisti, localizzate nel piede e deputate al mantenimento dell'equilibrio, e gli osfradi, situati nel canale esalante della cavità palleale, vicino al lato inferiore del muscolo adduttore posteriore, con funzioni olfattive o chemosensoriali (Westheide & Rieger, 2011).

Il sistema circolatorio di *Mytilus* è relativamente semplice ma efficiente. È composto da un cuore formato da due atri laterali e un ventricolo, che circonda l'intestino terminale. Gli atri, caratterizzati da pareti sottili, raccolgono l'emolinfa, il fluido circolante, dai tessuti e dai seni corporei, mentre il ventricolo, con pareti più spesse, si contrae per pompare l'emolinfa verso le diverse regioni del corpo, garantendo la distribuzione di ossigeno e nutrienti (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011).

Per quanto riguarda l'apparato digerente, i mitili mancano di un vero e proprio apparato boccale. La loro alimentazione si basa su un meccanismo di filtrazione: le branchie, grazie al movimento delle ciglia degli ctenidi, creano una corrente d'acqua che trasporta particelle alimentari all'interno della cavità palleale (Poli & Fabbri, 2018; Westheide &

Rieger, 2011). Un muco secreto nella cavità palleale aggrega queste particelle in cordoni che vengono poi diretti verso il solco alimentare e i palpi labiali. Qui avviene una selezione delle particelle in base alla dimensione: i mitili riescono a trattenere particelle di dimensioni comprese tra 7 e 10 μm (Poli & Fabbri, 2018; Westheide & Rieger, 2011). Il cibo selezionato passa attraverso un breve esofago fino allo stomaco, dove i dotti delle ghiandole digestive rilasciano enzimi. Una struttura peculiare dello stomaco dei bivalvi è lo stilo cristallino, un'appendice che ruota, grazie all'azione delle ciglia, contro la parete stomacale protetta da uno scudo gastrico. Lo stomaco presenta inoltre una regione cigliata e diverticoli digestivi che contribuiscono alla digestione (Westheide & Rieger, 2011). Le caratteristiche morfo-funzionali spiegano buona parte dell'interesse scientifico. Queste peculiarità anatomiche di *Mytilus* non solo riflettono un adattamento alla vita acquatica, ma costituiscono anche la base delle sue capacità di filtrazione e risposta agli stress ambientali, rendendolo un prezioso strumento di monitoraggio.

L'ampia escursione valvare, facilmente strumentabile con sensori elettromagnetici, rappresenta un parametro di allerta particolarmente sensibile. All'interno della cavità palliale si sviluppano branchie lamellari estremamente plicate che garantiscono contemporaneamente respirazione e filtrazione. Nei soggetti adulti di *M. galloprovincialis* la portata di filtrazione raggiunge in media 5 L h^{-1} per grammo di tessuto secco, valore che rende l'animale un campionatore passivo di numerosi xenobiotici disciolti o particolati (Vereycken & Aldridge, 2023). I contaminanti che superano la barriera branchiale sono indirizzati al tratto digerente, dove si localizzano in particolare nei lisosomi delle cellule digestive; la stabilità di queste membrane, valutabile con il saggio del Neutral Red Retention Time, si riduce in presenza di idrocarburi policiclici, pesticidi o miscele industriali (Bellas et al., 2016).

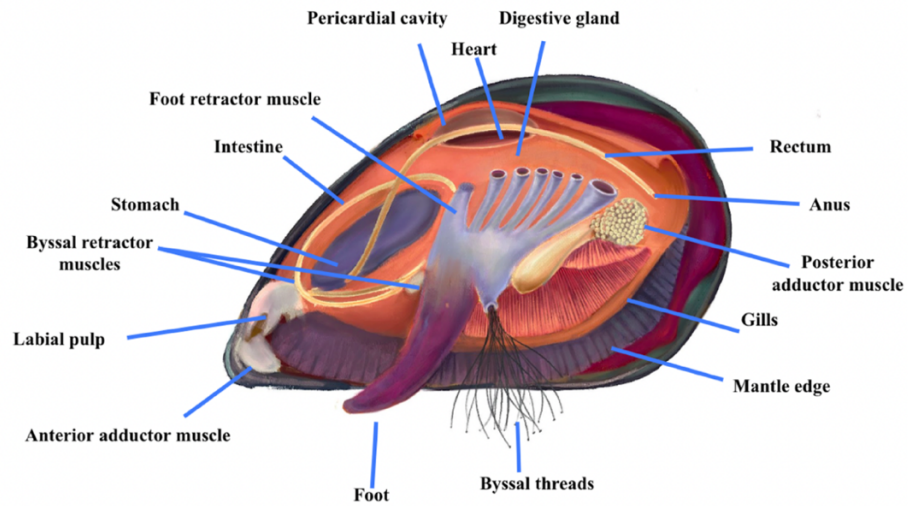


Figura 3: Anatomia di *M. galloprovincialis* (Batır et al., 2025).



Figura 4: Tre prospettive di *M. galloprovincialis*: a) aspetto esterno della conchiglia, b) vista laterale di entrambe le valve con l'interno visibile, c) vista interna di entrambe le valve. Immagine di Lamiot, 4 novembre 2006, da Wikimedia Commons.

Il sistema circolatorio, di tipo aperto, comprende un cuore tricamerale che invia emolinfa entro seni e lacune. Nell'emolinfa sono sospesi emociti fagocitari, metallotioneine a

elevata affinità per cationi bivalenti e un repertorio di enzimi antiossidanti (catalasi, superossido dismutasi, glutatione-perossidasi) la cui attività varia in modo coerente con l'esposizione a composti ossidanti o pro-ossidanti (Impellitteri et al., 2022; 2023). La semplice aspirazione di questo fluido consente prove rapide di vitalità cellulare, per esempio mediante esclusione del Trypan Blue, e analisi enzimatiche quantitative senza sacrificare l'animale (Ladhar-Chaabouni & Hamza-Chaffai, 2016).

Le specie citate presentano inoltre sedentarietà marcata, longevità pluri-annuale e tendenza a formare aggregazioni a elevata densità; tali caratteristiche permettono sia un'installazione stabile di stazioni di misura sia una buona riproducibilità dei dati nel tempo. A ciò si aggiunge la capacità di tollerare ampie escursioni di temperatura e, per *M. galloprovincialis*, di salinità, fattore che ne favorisce l'impiego in siti soggetti a stress antropici anche severi (Kroeker et al., 2014). Le variazioni dell'attività valvare, della produzione bissale e della frequenza cardiaca rappresentano i primi segnali misurabili in presenza di sostanze tossiche. In parallelo, il tracciamento continuo del battito cardiaco tramite fotopleletismografia infrarossa evidenzia bradicardie o tachicardie caratteristiche dello stress chimico (Vereycken & Aldridge, 2023).

Quando l'interesse si sposta dalle emergenze acute all'esposizione cronica, i marcatori biochimici forniscono un quadro integrato dell'effetto di miscele complesse. La diminuzione dei tempi di ritenzione del Neutral Red o l'incremento di malondialdeide sono considerati indicatori affidabili di perossidazione lipidica, mentre le attività di catalasi, superossido dismutasi e glutatione-perossidasi delineano i meccanismi di compenso antiossidante (Carella et al., 2018; Curpan et al., 2022). L'interpretazione congiunta dei dati comportamentali e di quelli biochimici, in linea con le raccomandazioni sul concetto di One Health, consente di individuare precocemente

condizioni di rischio per l'ecosistema e, di riflesso, per la salute pubblica (Connon et al., 2012; Storey et al., 2011).

La rilevanza di *M. galloprovincialis* come specie sentinella non dipende solo dalla sua morfologia filtratrice, ma anche dal ruolo economico-alimentare che la cozza mediterranea riveste da millenni nelle società rivierasche. Fonti indicano che le popolazioni dell'età del Bronzo, dai Cretesi ai Fenici, ne consumavano già abbondantemente i tessuti molli (Bailey, 1975; Waselkov, 1987), pratica che si è consolidata con Greci e Romani e che, in Galizia, è documentata dall'VIII secolo a.C. fino all'interno dell'Impero nel V secolo d.C. (Mejillón de Galicia, 2023). A Taranto, nella conca del Mar Piccolo, un atto notarile del 1525 registra la prima concessione ufficiale per l'allevamento di mitili, testimoniando una tradizione ancora oggi viva (Giordano et al., 2019). Dal Medioevo all'età moderna le tecniche di coltura si sono evolute dai pali di legno ("bouchot") e dalle zattere galleggianti ai moderni calzini di polipropilene introdotti negli anni Sessanta (Aypa, 1990; Figueras, 2011), rendendo la produzione di *M. galloprovincialis* una vera industria: nell'area Atlanto-Mediterranea si superano ormai le 300000 tonnellate annue, con la Spagna al primo posto (più di 200000 tonnellate), seguita da Italia, Grecia e Francia (Hough, 2022).

Questa espansione, supportata dal trasferimento di seme tra bacini – talvolta al di fuori dei canali legali (Giantsis et al., 2014) – ha favorito la presenza della specie in Asia orientale, dove la Cina produce oltre 800000 tonnellate l'anno fra *M. galloprovincialis* e *M. coruscus* (Smaal et al., 2019). Il risultato è una distribuzione geografica ancora più ampia rispetto a quella naturale, caratteristica che, dal punto di vista del biomonitoraggio, estende il potenziale raggio d'azione dei programmi di sorveglianza. Tuttavia, la crescita del settore implica anche nuove pressioni: l'affidamento quasi esclusivo alla raccolta di seme naturale può ridurre la variabilità genetica e, nel lungo termine, compromettere la

resilienza delle popolazioni coltivate; parallelamente, le strutture di allevamento fungono da vettori per specie alloctone o patogeni, con ricadute su ecosistemi nativi (Gozlan et al., 2024). Gli effetti del cambiamento climatico, innalzamento termico, acidificazione e incremento della frequenza di mareggiate, aggravano il quadro, aumentando la mortalità in impianti a zattera e long-line e indebolendo la calcificazione delle nuove generazioni (Mangano et al., 2019; Zhao et al., 2020).

Tali elementi aggiungono un'ulteriore dimensione alla scelta dei bivalvi come sonde biologiche: non si tratta più soltanto di valutare la qualità dell'acqua per la conservazione degli ecosistemi, ma di garantire la sicurezza alimentare e la sostenibilità economica di un comparto che, in Europa, assicura migliaia di posti di lavoro e rappresenta una fonte proteica a basso impatto ambientale. Integrare i parametri comportamentali e biochimici precedentemente descritti (movimenti valvari, frequenza cardiaca, produzione bissale, indici lisosomiali e redox) con il monitoraggio delle pratiche di allevamento consente di anticipare focolai di contaminazione, per esempio biotossine algali o metalli pesanti, prima che il prodotto entri nella filiera commerciale, in piena coerenza con il paradigma One Health che unisce tutela ambientale, salute pubblica e sviluppo socio-economico (Connon et al., 2012; Impellitteri et al., 2023).

1.5 Obiettivi e descrizione del progetto

Il presente progetto di dottorato nasce dall'esigenza – evidenziata dalle recenti linee guida europee e dal paradigma One Health – di colmare le lacune conoscitive sugli effetti dei contaminanti emergenti sugli organismi filtratori marini e, parallelamente, di individuare strategie di mitigazione ecocompatibili. L'obiettivo generale è duplice.

Da un lato si vuole caratterizzare in maniera sistematica la risposta fisiologica, biochimica e molecolare di *M. galloprovincialis* all'esposizione a diverse classi di CE che vanno dai biocidi ai tensioattivi, dalle microplastiche ai residui farmaceutici. Dall'altro lato si intende valutare l'efficacia protettiva di due bioprodotti a forte potenziale applicativo: l'estratto di bergamotto (*Citrus bergamia*) e gli idrolizzati proteici della mosca soldato nera (*Hermetia illucens*), come possibili interventi nutraceutici o additivi in scenari di acquacoltura sostenibile e di biorisanamento integrato.

Per conseguire tali finalità, il lavoro è articolato in tre fasi principali. Nella prima fase si analizzeranno gli effetti tossicologici di singoli contaminanti. La seconda fase verificherà la capacità dei due bioprodotti selezionati di attenuare i danni indotti dai CE in scenari di Integrated Multi-Trophic Aquaculture o di biorisanamento.

I risultati attesi, presentati nei Capitoli 5 e 6, mirano a:

- (i) produrre nuovi dati di riferimento per la valutazione del rischio ecotossicologico dei contaminanti emergenti nei bivalvi;
- (ii) proporre protocolli standardizzati che possano essere sfruttati per valutare l'impatto di xenobiotici ambientali;
- (iii) testare soluzioni nutraceutiche o biotecnologiche in grado di ridurre l'impatto dei CE lungo la filiera produttiva e alimentare.

In ultima analisi, il progetto intende fornire raccomandazioni operative utili sia alle autorità preposte alla qualità delle acque, sia al settore mitilicolo, contribuendo a rafforzare, con un approccio olistico, la tutela congiunta dell'ambiente, della salute animale e della salute umana.

2. CLASSIFICAZIONE E PROPRIETÀ DEI CONTAMINANTI EMERGENTI SELEZIONATI

2.1 Biocidi e conservanti

I biocidi e i conservanti costituiscono una categoria di composti chimici di fondamentale importanza per il controllo della crescita microbica e la preservazione di prodotti in numerosi settori industriali e domestici. Queste sostanze, progettate per prevenire la contaminazione biologica, vengono ampiamente impiegate in formulazioni che spaziano dai cosmetici ai materiali da costruzione, fino ai sistemi di trattamento delle acque. Tuttavia, il loro utilizzo diffuso solleva preoccupazioni legate alla loro persistenza ambientale, alla potenziale tossicità per gli organismi non target e agli effetti sulla salute umana. Tra le classi più rappresentative di questi composti, gli isotiazolinoni e il Quaternium-15 si distinguono per la loro efficacia e pervasività, pur appartenendo a famiglie chimiche distinte con meccanismi d'azione e profili tossicologici diversi. Gli isotiazolinoni sono composti eterociclici noti per la loro potente attività antimicrobica, mentre il Quaternium-15, un sale di ammonio quaternario, agisce principalmente come conservante rilasciando formaldeide. Nonostante condividano funzioni antimicrobiche, queste due classi differiscono sostanzialmente per struttura chimica, meccanismo d'azione e profilo tossicologico, giustificando un'analisi separata delle loro caratteristiche e implicazioni. Questo capitolo si propone di esaminare le caratteristiche di entrambe le classi, analizzandone le proprietà chimiche, gli usi industriali, la presenza ambientale, il comportamento nei bivalvi e gli effetti biologici documentati, concludendo

con l'identificazione delle lacune conoscitive che rappresentano opportunità per ricerche future.

2.1.1. *Isotiazolinoni (BIT, OIT, CMIT)*

Gli isotiazolinoni costituiscono una classe di composti biocidi la cui struttura chimica è caratterizzata da un anello eterociclico pentatomico contenente azoto e zolfo (Figura 5). Questa particolare configurazione molecolare conferisce loro un'elevata reattività nei confronti dei microrganismi bersaglio (Kim et al., 2019). Tra i rappresentanti più significativi di questa famiglia chimica si distinguono il benzisotiazolinone (BIT), il 2-n-ottil-4-isotiazolin-3-one, o più comunemente noto come ottil isotiazolinone (OIT) e il metilcloroisotiazolinone (CMIT). Sebbene questi composti condividano l'architettura molecolare di base, si differenziano per la natura dei sostituenti presenti sull'anello eterociclico, caratteristica che ne influenza profondamente sia le proprietà chimico-fisiche sia gli ambiti applicativi (Impellitteri et al., 2025a; Schwensen & Johansen, 2018).

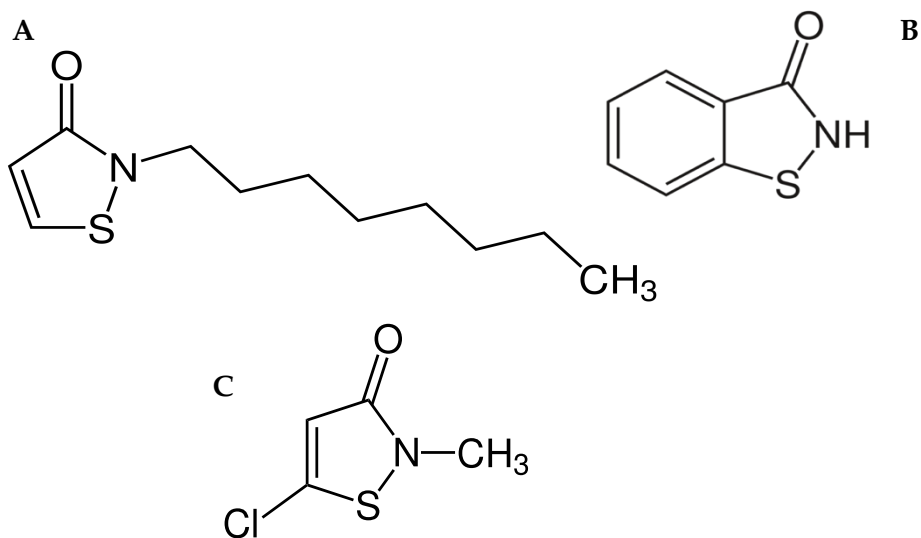


Figura 5: Strutture chimiche dei principali isotiazolinoni: (A) il 2-n-ottil-4-isotiazolin-3-one (OIT) (B) il Benzisotiazolinone (BIT) e (C) il Metilcloroisotiazolinone.

Dal punto di vista delle proprietà fisico-chimiche, gli isotiazolinoni manifestano una solubilità in acqua che varia considerevolmente in funzione della struttura molecolare specifica. Tale caratteristica li rende particolarmente idonei per l'incorporazione in formulazioni a base acquosa, sebbene esistano differenze sostanziali tra i vari composti. Il BIT, ad esempio, presenta una solubilità acquosa relativamente modesta (0,8 mg/mL), fattore che può influenzare significativamente il suo assorbimento a livello polmonare in caso di esposizione per via inalatoria. Questi composti dimostrano inoltre una notevole stabilità chimica in condizioni ambientali ordinarie: il BIT mantiene la sua integrità strutturale in ambiente acquoso con un'emivita superiore ai 30 giorni e conserva le sue proprietà biocide anche dopo tre mesi di esposizione alla radiazione solare (Bollmann et al., 2017; Epa, 2009; Lugg et al., 2001; Rafoth et al., 2007; United States Environmental Protection Agency, 2005).

La reattività chimica degli isotiazolinoni è principalmente attribuibile alla presenza dell'atomo di zolfo in stato ridotto, che facilita la formazione di legami covalenti con gruppi funzionali presenti nelle biomolecole (Kim et al., 2019). Studi farmacocinetici condotti su modelli murini hanno evidenziato che il BIT presenta un volume di distribuzione limitato ($V_{dss} = 129 \text{ mL/kg}$) se confrontato con il volume totale di acqua corporea, suggerendo una distribuzione tissutale circoscritta e una tendenza a rimanere confinato nel compartimento vascolare. Questo comportamento è ulteriormente confermato dall'elevata affinità per le proteine plasmatiche, con valori di legame superiori al 99,4% (Barndök et al., 2014; Bregnbak et al., 2013; Broséuset al., 2009).

Il meccanismo d'azione antimicrobica degli isotiazolinoni si basa sulla loro capacità di interagire selettivamente con i gruppi tiolici (-SH) presenti nelle proteine microbiche (Figura 6). Questa interazione porta alla formazione di legami covalenti stabili che compromettono irreversibilmente la funzionalità di enzimi essenziali per la sopravvivenza cellulare (Kim et al., 2019). Nel caso specifico del BIT, l'atomo di zolfo in forma ridotta catalizza la formazione di ponti disolfuro (-S-S-) con i residui di cisteina, provocando l'inattivazione di proteine contenenti questo aminoacido. Tale meccanismo si traduce nell'inibizione efficace della crescita e dell'attività metabolica di diversi microrganismi, inclusi batteri come *Escherichia coli* (con concentrazioni inibitorie minime di $15 \mu\text{g/mL}$), alghe e anche organismi superiori come i pesci (Collier et al., 1990a,b; Morley et al., 1998). Questa versatilità d'azione conferisce agli isotiazolinoni un ampio spettro di attività biologiche, comprendenti proprietà antibatteriche, antimicotiche e antivirali (Silva et al., 2020).

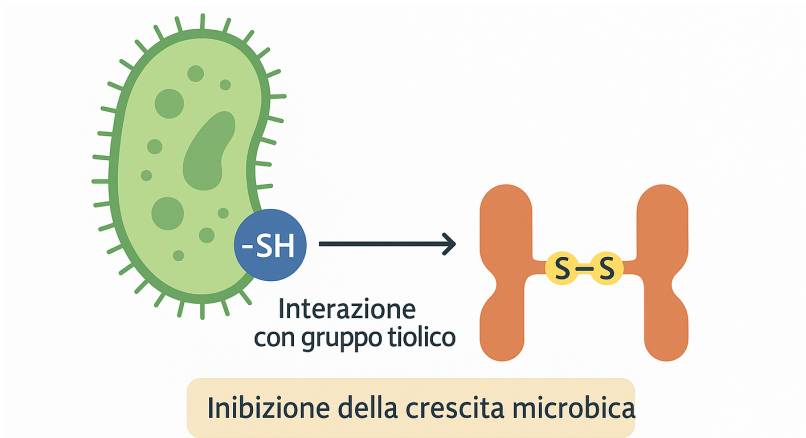


Figura 6: Meccanismo d'azione antimicrobica degli isotiazolinoni: formazione di ponti disolfuro tra l'atomo di zolfo del biocida e i residui di cisteina delle proteine microbiche.

Il metilcloroisotiazolinone (CMIT) merita una particolare attenzione nel contesto degli isotiazolinoni biocidi a causa del crescente interesse scientifico per la sua proprietà tossicologica, in particolare per quanto riguarda la sensibilizzazione cutanea. Tale composto ha acquisito particolare rilevanza clinica a seguito della sua associazione con dermatiti allergiche da contatto, specialmente in seguito all'esposizione attraverso prodotti per la cura della persona (Schwensen & Johansen, 2018).

Il CMIT presenta caratteristiche strutturali che ne determinano un comportamento tossicologico peculiare. La presenza del sostituito clorato sull'anello isotiazolinonico conferisce al composto proprietà chimico-fisiche distintive, tra cui un peso molecolare relativamente basso che facilita la penetrazione attraverso la barriera cutanea e la successiva interazione con macromolecole cutanee (Garcia-Hidalgo et al., 2018). Questa capacità di attraversare facilmente lo strato corneo rappresenta un fattore determinante nel potenziale sensibilizzante del composto. Dal punto di vista della classificazione normativa, il CMIT è ufficialmente riconosciuto come sensibilizzante cutaneo dal Regolamento della Commissione Europea (CE) n. 1272/2008 (Regulation (EC) No 1272/2008). Tale classificazione riflette l'accumulo di evidenze scientifiche e cliniche

riguardo al suo potenziale allergizzante. Studi epidemiologici hanno documentato che in pazienti affetti da dermatiti, l'allergia da contatto a MIT e CMIT è stata riscontrata fino all'11,1% dei casi (Johnston, 2014), evidenziando l'importanza clinica di questi composti nel panorama delle dermatiti allergiche da contatto. La letteratura scientifica ha documentato numerosi casi clinici di reazioni dermatologiche conseguenti all'esposizione al CMIT (Latheef & Wilkinson, 2015), confermando il profilo di rischio associato a questo biocida. Il meccanismo alla base della sensibilizzazione cutanea è riconducibile alla capacità del CMIT di formare legami covalenti con proteine cutanee, creando complessi aptene-proteina che vengono riconosciuti dal sistema immunitario come antigeni estranei, scatenando così una risposta immunitaria di tipo IV (ipersensibilità ritardata).

Nel contesto delle applicazioni commerciali, gli isotiazolinoni vengono incorporati in numerose formulazioni come agenti conservanti e disinfettanti. I composti OIT, BIT, e CMIT sono comunemente impiegati in preparazioni destinate sia all'ambito industriale che sanitario, con concentrazioni che variano significativamente in base alla specifica applicazione. Il loro ampio utilizzo come agenti antimicrobici in formulazioni industriali, prodotti domestici e materiali sanitari ha portato alla loro rilevazione in diversi comparti ambientali, sollevando preoccupazioni riguardo ai potenziali effetti ecotossicologici, specialmente negli ecosistemi acquatici (Paijens et al., 2020; Schwensen & Johansen, 2018).

Particolarmente rilevante è il caso dei concentrati provenienti da sistemi di osmosi inversa (ROCs) negli impianti di trattamento delle acque reflue, dove il BIT può raggiungere concentrazioni fino a 160 mg/L, essendo utilizzato per prevenire la formazione di biofilm sulle membrane filtranti (Impellitteri et al., 2025a; Schwensen & Johansen, 2018; Tang et al., 2012). La pandemia da COVID-19 ha determinato un

incremento esponenziale nell'utilizzo di questi biocidi, particolarmente in ambito ospedaliero e nelle strutture di assistenza a lungo termine, dove la loro presenza è stata documentata in dispositivi di protezione individuale quali guanti monouso e indumenti protettivi (Huang et al., 2023; Multisanti et al., 2023, 2024). Questo aumento dell'utilizzo, legato particolarmente al periodo pandemico COVID-19, ha intensificato la preoccupazione per la loro diffusione ambientale.

L'efficacia degli isotiazolinoni nel controllo della contaminazione microbica ne ha determinato l'adozione in un'ampia varietà di settori industriali. Il loro impiego spazia dai prodotti cosmetici (benché soggetti a restrizioni normative nell'Unione Europea) alle vernici per pareti esterne, dai lucidanti ai detergenti, dai coloranti per stampa ai materiali cartacei trattati. Trovano inoltre applicazione come conservanti in formulazioni di pesticidi, nei fluidi per la lavorazione dei metalli, nei sistemi di raffreddamento industriali e negli impianti di trattamento delle acque mediante osmosi inversa (Flyvholm, 1991; Maienfisch et al., 2017; Rafoth et al., 2007; Taubert et al., 2002; Schwensen & Johansen, 2020; Uter et al., 2022; Wang et al., 2019). Il settore edilizio ha registrato un incremento particolarmente marcato nella domanda di questi composti, con il BIT che ha progressivamente sostituito i conservanti tradizionali nelle vernici a base acquosa, offrendo un'alternativa alle formulazioni a base di solventi organici.

2.1.2. *Quaternium-15*

Il Quaternium-15 (CAS N° 4080-31-3), chimicamente noto come esametilentetramina cloroallil cloruro, rappresenta uno dei conservanti più utilizzati nella classe dei composti di ammonio quaternario (QACs) (De Groot et al., 2010). La sua sintesi avviene attraverso la reazione dell'esametilentetramina con 1,3-dicloropropene, processo che genera una

miscela di isomeri cis e trans. La struttura molecolare, rappresentata dalla formula $[N_4H_{12}C_6 - CH_2CH = CHCl] Cl^-$, è caratterizzata da un gruppo ammonico centrale che porta una carica positiva permanente, legato a sostituenti alchilici e aromatici (Figura 7) (Arnold et al., 2023). La peculiarità distintiva di questo composto risiede nella sua capacità di rilasciare formaldeide libera: a concentrazioni dello 0,1% nei prodotti per la cura personale, il Quaternium-15 può liberare fino a 100 ppm di formaldeide, sostanza riconosciuta come potenziale allergene e classificata come cancerogena (Fasth et al., 2018; Shaughnessy et al., 2014; Toholka and Nixon, 2014).

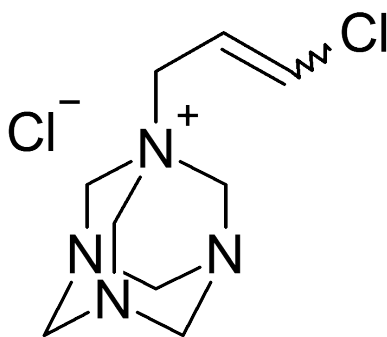


Figura 7: Struttura chimica del Quaternium-15.

Dal punto di vista delle proprietà fisico-chimiche, il Quaternium-15 si presenta come una polvere color crema dall'odore pungente, con un peso molecolare di 251 g/mol. Contrariamente a quanto ci si potrebbe aspettare per un sale di ammonio quaternario, mostra una solubilità limitata in acqua e risulta insolubile negli oli minerali. Nonostante questa limitata solubilità, il composto dimostra una notevole persistenza ambientale grazie alla sua natura lipofila e alla resistenza alla degradazione metabolica. Queste caratteristiche gli permettono di permanere negli ecosistemi acquatici per anni dopo il rilascio, dove può essere facilmente assorbito dagli organismi marini in diverse concentrazioni (Faggio et al., 2016; Pagano et al., 2016). La struttura chimica del

composto contribuisce alla sua stabilità e alla resistenza ai normali processi di depurazione: gli impianti di trattamento delle acque reflue riescono a rimuovere solo il 25% dei contaminanti emergenti di questa categoria (Kumar et al., 2022; Puri et al., 2023). Il meccanismo d'azione antimicrobica del Quaternium-15 si basa sul rilascio controllato di formaldeide, che agisce come agente biocida (Figura 8. La formaldeide rilasciata interferisce con le proteine cellulari dei microrganismi attraverso la formazione di legami crociati, compromettendo l'integrità delle membrane cellulari e le funzioni enzimatiche essenziali. Questo meccanismo conferisce al composto un'ampia efficacia come antimicrobico, stabilizzante e disinfettante, proprietà che ne hanno determinato l'utilizzo sin dal secolo scorso. Particolarmente significativo è stato l'incremento del 62% nell'impiego di ammoni quaternari durante la pandemia da COVID-19, dovuto alle loro proprietà antibatteriche e disinfettanti (Marteinson et al., 2022). Tuttavia, lo stesso meccanismo che ne garantisce l'efficacia antimicrobica rappresenta anche la fonte della sua tossicità per gli organismi non-target, alterando l'equilibrio ecologico degli ambienti acquatici.

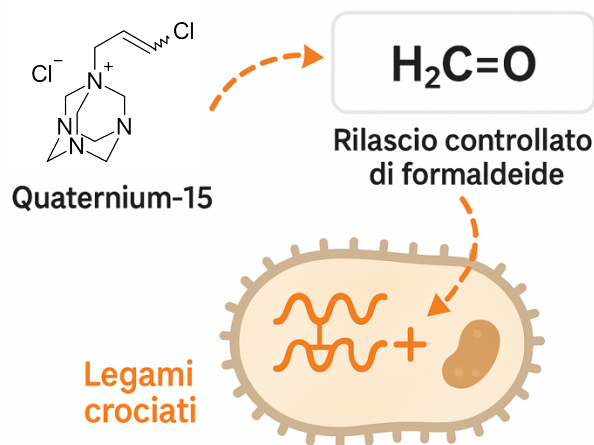


Figura 8: Meccanismo d'azione antimicrobica del Quaternium-15: rilascio controllato di formaldeide e formazione di legami crociati con le proteine cellulari dei microrganismi.

Le formulazioni commerciali contenenti Quaternium-15 presentano concentrazioni variabili in base all'applicazione specifica. Nei prodotti per la cura personale, la concentrazione tipica si attesta intorno allo 0,1% (1000 ppm), sufficiente per garantire l'azione conservante mantenendo teoricamente un profilo di sicurezza accettabile per l'uso umano (Maier et al., 2009). La tossicità del composto è stata ampiamente documentata in studi su modelli animali terrestri: somministrazioni orali a ratti, pulcini e porcellini d'India hanno evidenziato un'elevata tossicità sistemica. Recentemente, l'esposizione di cellule ematiche bovine ed equine a diverse concentrazioni di Quaternium-15 ha mostrato effetti negativi significativi sui parametri ematologici (Arrigo et al., 2023). Le formulazioni industriali possono contenere concentrazioni superiori, in particolare nei prodotti destinati alla disinfezione e sanificazione, dove l'efficacia antimicrobica è prioritaria rispetto alle considerazioni dermatologiche.

L'impiego del Quaternium-15 abbraccia un'ampia gamma di settori applicativi, riflettendo la sua versatilità come conservante e agente antimicrobico. Nel settore cosmetico, trova applicazione in shampoo, saponi per il corpo, creme, prodotti per la rasatura e diverse categorie di cosmetici, dove previene la proliferazione microbica e prolunga la vita utile dei prodotti (Arrigo et al., 2023; Impellitteri et al., 2023a, 2024a; Multisanti et al., 2023; Nikle et al., 2019). Nei detergenti per la casa, il composto svolge una duplice funzione come tensioattivo e conservante, contribuendo sia all'azione pulente che alla stabilità del prodotto. In ambito industriale, il Quaternium-15 è utilizzato in formulazioni specializzate per la sanificazione di superfici e attrezzature. Nonostante l'ampio utilizzo, gli studi sugli effetti negli organismi acquatici rimangono limitati, con valutazioni preliminari condotte principalmente sulla cozza mediterranea *M. galloprovincialis* (Faggio et al., 2016; Pagano et al., 2016), evidenziando

una significativa lacuna nella comprensione dell'impatto ecologico di questo contaminante emergente.

2.2 Tensioattivi e detergenti

I tensioattivi rappresentano una vasta categoria di composti chimici caratterizzati da proprietà anfifiliche, ovvero dalla presenza simultanea di una porzione idrofoba e una idrofila nella stessa molecola. Questa peculiare architettura molecolare conferisce loro la capacità di ridurre la tensione superficiale all'interfaccia tra fasi immiscibili, rendendoli componenti essenziali in numerose applicazioni industriali e domestiche. Nell'attuale panorama dei contaminanti emergenti, i tensioattivi occupano una posizione di particolare rilevanza, essendo tra le sostanze più ampiamente disperse negli ecosistemi acquatici a livello globale (Ebele et al., 2017; Lorenzo et al., 2018; Richardson e Ternes, 2014, 2018; Richardson e Kimura, 2016).

I prodotti per la cura personale (PCPs), che includono tensioattivi, agenti schiumogeni, agenti bagnanti, detergenti, emulsionanti solubilizzanti e antimicrobici, rappresentano una delle categorie più significative di contaminanti emergenti, con un numero crescente di queste sostanze già incluse nella Watch List adottata dall'Unione Europea (Brausch e Rand, 2011; Montesdeoca-Esponda et al., 2018). La capacità di questi composti di abbassare la tensione superficiale dei liquidi, facilitandone la diffusione, li rende ingredienti ubiquitari in detergenti e cosmetici (Ramos et al., 2015; Sharma et al., 2009; Teo et al., 2015).

Una problematica centrale associata ai tensioattivi riguarda la loro persistenza ambientale. Molti di questi composti non sono suscettibili a biodegradazione completa, venendo scaricati nelle acque riceventi nelle loro forme parentali. Inoltre, i metaboliti

coniugati possono riconvertirsi nelle forme parentali libere, mentre numerosi PCPs e i loro metaboliti presentano potenziale di bioaccumulo e/o sono sostanze bioattive che possono mettere a rischio gli organismi viventi (Peck, 2006; Mackay e Barnhouse, 2010; Biel-maeso et al., 2018). Si stima che circa 60.000 tonnellate di detergenti vengano riversate annualmente nel solo Mar Mediterraneo, contribuendo significativamente all'inquinamento delle acque costiere (Della Croce et al., 2001).

I tensioattivi anionici, che rappresentano una categoria importante di inquinanti, sono ancora ampiamente utilizzati nella produzione di numerosi beni di consumo grazie alle loro proprietà tensioattive. Questi composti hanno una forte tendenza a legarsi alla componente lipidica delle membrane cellulari, e ad alte concentrazioni possono alterare la disposizione strutturale della membrana compromettendone la funzionalità (Brunelli et al., 2008; Van den Heuvel et al., 2000). L'apparato branchiale e la cute, essendo continuamente esposti al mezzo acquatico, rappresentano i principali siti di attività di numerose sostanze tossiche negli organismi acquatici (Van den Heuvel et al., 2000).

2.2.1. Laurilsolfato di sodio (SLS)

Il Laurilsolfato di sodio (SLS), noto anche come Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), rappresenta probabilmente il tensioattivo anionico più utilizzato e studiato a livello globale (Chaturvedi e Kumar, 2010). Dal punto di vista strutturale, la molecola è costituita da una catena idrocarburica lineare di 12 atomi di carbonio (coda idrofoba) legata a un gruppo solfato idrofilo, configurazione che conferisce le proprietà anfifiliche necessarie per l'azione detergente (Figura 9). La formula chimica è $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, con un peso molecolare di 288,38 g/mol. A temperatura ambiente, l'SLS si presenta come una polvere cristallina bianca, caratterizzata da elevata solubilità in acqua ed etanolo. La

molecola viene prodotta industrialmente attraverso la solfonazione dell'1-dodecanolo (alcool laurilico, C₁₂H₂₅OH) seguita dalla neutralizzazione con carbonato di sodio. Attraverso processi di etossilazione, l'SLS può essere convertito in Sodium Laureth Sulfate (SLES), un derivato meno aggressivo verso la pelle poiché, essendo un solvente meno efficace, risulta meno aggressivo nei confronti delle proteine.

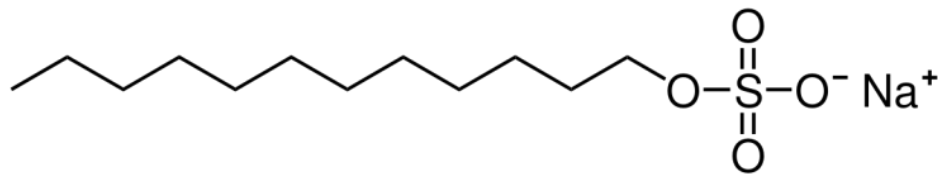


Figura 9: Struttura chimica dell'SLS.

Il meccanismo d'azione del Laurilsolfato di sodio (SLS), o Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), è strettamente legato alla sua natura anfifilica. La lunga catena alchilica a 12 atomi di carbonio interagisce con le componenti lipidiche, mentre il gruppo carbossilico solfonato, fortemente idrofilo e carico negativamente, interagisce con la fase acquosa. Questa duplice affinità consente all'SLS di ridurre drasticamente la tensione superficiale dell'acqua, favorendo la miscelazione tra fasi polari e apolari, ovvero acqua e composti grassi o oleosi (Chaturvedi & Kumar, 2010). Quando l'SLS raggiunge una concentrazione critica (Critical Micelle Concentration, CMC), le sue molecole si organizzano spontaneamente in strutture sovramolecolari dette micelle. All'interno delle micelle, le code idrofobiche si orientano verso l'interno, inglobando sostanze apolari, mentre i gruppi solfato idrofili restano esposti verso l'acqua, favorendo l'emulsione e la solubilizzazione di oli e impurità lipidiche (Sulek et al., 2010) (Figura 10). Questo processo spiega la sua capacità detergente e schiumogena, ampiamente sfruttata nei

prodotti cosmetici e nelle formulazioni per la pulizia. A livello biologico, il medesimo meccanismo è responsabile degli effetti avversi osservati sugli organismi viventi. L'SLS interagisce con i doppi strati fosfolipidici delle membrane cellulari: si lega alle teste lipidiche e alle proteine transmembrana destabilizzando la membrana, con conseguente perdita di integrità e alterazioni della permeabilità ionica (Brunelli et al., 2008). In esposizione cronica o a concentrazioni elevate, ciò può causare rottura dell'equilibrio osmotico, lisi cellulare, e processi citotossici mediati dallo stress ossidativo (Nunes et al., 2005; Messina et al., 2014). Studi ecotossicologici su organismi acquatici hanno infatti evidenziato che l'SLS è in grado di indurre perossidazione lipidica (LPO), alterazioni nei livelli di glutatione (GSH/GSSG) e modifiche nell'attività di enzimi antiossidanti (SOD, CAT, GPx), marcatori tipici di uno stato di stress ossidativo (Almeida et al., 2015; Freitas et al., 2019). Questa azione destabilizzante sulle membrane non si limita alle cellule umane o animali, ma riguarda anche microrganismi, spiegando l'attività antimicrobica secondaria dell'SLS e la sua capacità di disintegrare biofilm batterici.

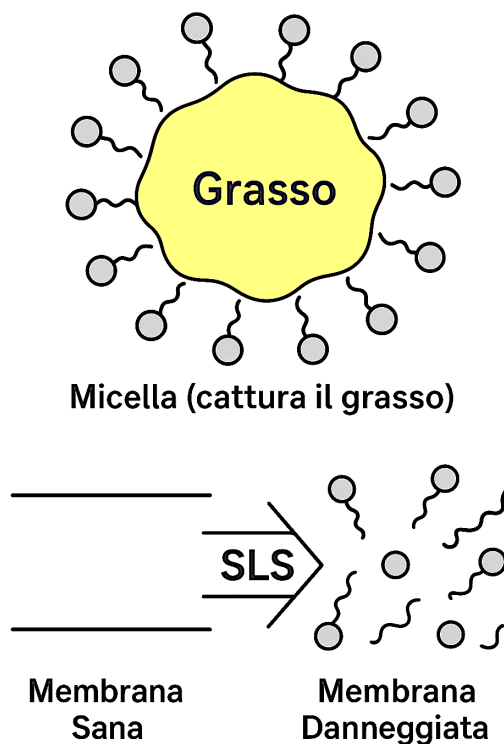


Figura 10: Meccanismo d'azione del Sodio Lauril Solfato (SLS). A) Le molecole di SLS, grazie alla loro natura anfipatica, si organizzano in micelle intrappolando le particelle lipidiche: le code idrofobiche interagiscono con il grasso mentre le teste idrofile restano esposte verso l'ambiente acquoso, favorendo la solubilizzazione e la rimozione dei lipidi. B) Lo stesso meccanismo può compromettere l'integrità delle membrane cellulari: l'inserzione delle molecole di SLS nei doppi strati fosfolipidici ne altera l'ordine e la continuità strutturale, determinando disgregazione e perdita della funzione barriera.

L'SLS è uno dei tensioattivi anionici più utilizzati a livello globale, impiegato in una vasta gamma di settori grazie alle sue proprietà chimico-fisiche.

- Industria cosmetica e prodotti per la cura personale: rappresenta uno degli ingredienti più comuni in shampoo, dentifrici, collutori, saponi liquidi, bagnoschiuma, creme da barba e detergenti per il viso. In questi prodotti garantisce sia il potere schiumogeno sia la capacità di solubilizzare il sebo e le impurità oleose dalla pelle e dai capelli (Chaturvedi & Kumar, 2010; Messina et al., 2014).

- Farmaceutica: viene usato come eccipiente nelle formulazioni orali e topiche per aumentare la solubilità dei principi attivi poco idrosolubili e migliorare l'assorbimento attraverso pelle, mucose e tratto gastrointestinale (Asio et al., 2023; Hauthal, 1992). Grazie alla sua capacità di agire come permeabilizzante delle membrane biologiche, l'SLS è incluso in composti farmaceutici e dermo-cosmetici con funzione veicolante.
- Industria chimica e applicazioni industriali: trova applicazione nella produzione di detersivi per stoviglie, detersivi per bucato, prodotti antincendio (schiume estinguenti), agenti flocculanti, de-inking agents per la rimozione di inchiostri dalla carta riciclata, e fluidi lubrificanti basati su acqua (Cserhádi et al., 2002; Fatma et al., 2015). Le sue proprietà tribologiche (ossia la capacità di ridurre attrito e usura grazie alla formazione di film superficiali) lo rendono interessante anche in formulazioni industriali innovative per fluidi operativi.

2.2.2 Alcol Polivinilico (PVA)

L' Alcol polivinilico (PVA) è un polimero sintetico che occupa una posizione unica nel panorama dei materiali polimerici, principalmente per il fatto di non essere sintetizzato attraverso la polimerizzazione diretta del suo monomero strutturale, l'alcol vinilico, a causa della sua instabilità termodinamica (Li et al., 2000). La sua sintesi, messa a punto per la prima volta da Hermann e Haehnel nel 1924, avviene invece tramite l'idrolisi di un altro polimero, il polivinil acetato (PVAc) (Aslam et al., 2018). Questa caratteristica, unita alle sue eccezionali proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità e solubilità in acqua, lo ha reso uno dei polimeri idrosolubili di maggior rilevanza commerciale e scientifica a livello globale (Tang et al., 2010).

Dal punto di vista strutturale, il PVA è un polimero lineare semicristallino la cui unità ripetitiva è $[\text{CH}_2\text{CHOH}]_n$ (Figura 11). La presenza di un gruppo idrossilico (-OH) su ogni due atomi di carbonio della catena principale è l'elemento chiave che ne determina le proprietà chimico-fisiche, in particolare l'elevata idrofilia e la capacità di formare legami idrogeno inter- e intra-catena (Abdullah et al., 2017). Questi legami idrogeno sono responsabili della sua natura semicristallina e delle sue notevoli proprietà meccaniche. Il processo di produzione commerciale prevede l'idrolisi controllata (saponificazione) del PVAc, tipicamente attraverso uno scambio estereo con metanolo in presenza di un catalizzatore alcalino come l'idrossido di sodio o il metilato di sodio (Mahanta et al., 2011). Il parametro fondamentale che definisce le caratteristiche del prodotto finale è il grado di idrolisi, ovvero la percentuale di gruppi acetato che vengono convertiti in gruppi idrossilici. In base a questo, il PVA viene classificato in due categorie principali: parzialmente idrolizzato e completamente idrolizzato (Mahanta et al., 2011). Il grado di idrolisi influenza drasticamente le proprietà del polimero: ad esempio, la resistenza alla trazione di un PVA idrolizzato al 99% si attesta tra 67-110 MPa, mentre scende a 24-79 MPa per un grado di idrolisi inferiore di appena il 10% (Ye et al., 2014). Analogamente, la solubilità in acqua si riduce drasticamente per gradi di idrolisi inferiori al 30 mol% (Aslam et al., 2017). A temperatura ambiente, il PVA si presenta come una polvere granulare di colore bianco o crema, traslucida, inodore e insapore (Mahanta et al., 2011). È altamente solubile in acqua, leggermente solubile in etanolo, ma insolubile nella maggior parte degli altri solventi organici. Una soluzione acquosa al 5% di PVA presenta un pH tipicamente compreso tra 5,0 e 6,5 (Mahanta et al., 2011). Il peso molecolare del PVA disponibile in commercio varia generalmente tra 30.000 e 200.000 g/mol, un valore relativamente basso per un polimero radicalico, attribuibile a fenomeni di scissione della catena che possono verificarsi durante il processo di idrolisi (Bai et al., 2014). È

considerato un polimero non tossico, innocuo per i tessuti viventi e biodegradabile, con una degradabilità che è potenziata proprio dalla presenza dei gruppi idrossilici (Abdullah et al., 2017; Marín et al., 2014; Gaaz et al., 2015; Saini et al., 2017).

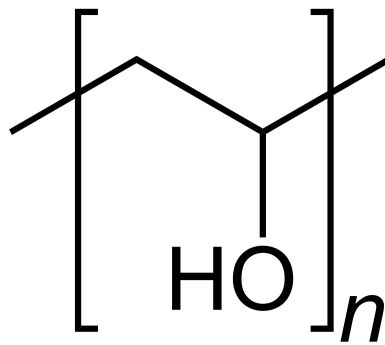


Figura 11: Struttura chimica del PVA.

Il "meccanismo d'azione" del PVA si riferisce principalmente al suo comportamento funzionale piuttosto che a un'interazione tossicologica. La sua efficacia in diverse applicazioni deriva dalla capacità dei gruppi idrossilici di formare una fitta rete di legami idrogeno (Figura 12). Questa rete conferisce al materiale coesione, flessibilità e resistenza, permettendogli di formare film, fibre e idrogel stabili. A livello molecolare, il PVA agisce come una matrice polimerica eccezionalmente versatile. La sua natura idrofila lo rende un'ottima matrice per la dispersione di nanofiller inorganici (come ossidi metallici, solfuri, grafene) o organici. L'ampia area superficiale esposta dai nanofiller può interagire con i gruppi -OH del PVA, portando a un significativo miglioramento delle proprietà ottiche, meccaniche, elettriche e termiche del nanocomposito risultante (Aslam et al., 2017; Kumar et al., 2012; Moulay et al., 2015). I gruppi idrossilici fungono anche da siti attivi per ulteriori modifiche chimiche (es. acetalizzazione, esterificazione), consentendo di "sintonizzare" finemente le proprietà del polimero per applicazioni specifiche (Moulay et al., 2015). Inoltre, questa struttura lo

rende una eccellente barriera all'ossigeno e agli aromi in condizioni di bassa umidità (Gaaz et al., 2015; Halima et al., 2016).

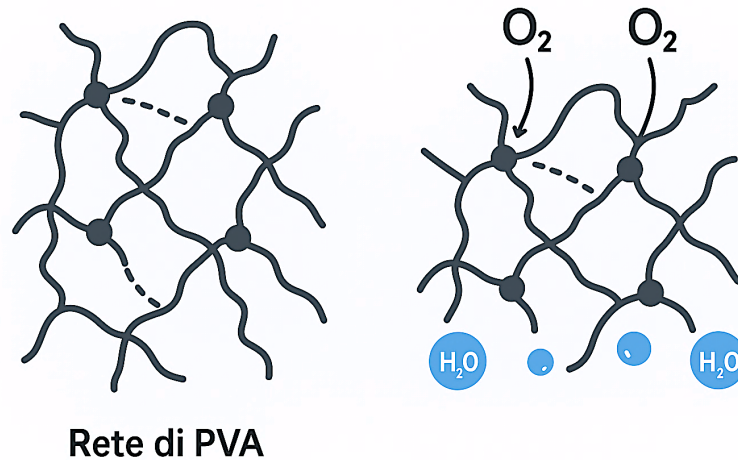


Figura 12: Meccanismo barriera dell'alcol polivinilico (PVA). A sinistra: la rete polimerica di PVA, stabilizzata da legami a idrogeno, forma una struttura compatta e ordinata. A destra: la stessa rete agisce come barriera selettiva, ostacolando la diffusione dell'ossigeno (O_2), mentre le molecole d'acqua (H_2O) possono interagire con la matrice o attraversarla parzialmente.

La sua produzione globale ha raggiunto 1.124 chilo-tonnellate nel 2016, con Asia-Pacifico, USA ed Europa come principali produttori (Saunders et al., 2013; Statista, 2018). Grazie alla sua combinazione unica di proprietà, il PVA è impiegato in un'ampia gamma di settori industriali, commerciali, medici e alimentari (Abdullah et al., 2017; Aslam et al., 2017; Kumar et al., 2012):

- Settore biomedico e farmaceutico: la sua biocompatibilità e atossicità lo rendono un materiale d'elezione per applicazioni a contatto con i tessuti viventi. Viene utilizzato per produrre fili chirurgici, particelle per embolizzazione, lacrime artificiali, lenti a contatto, sostituti della cartilagine e del menisco, e barriere anti-adesione in chirurgia (Li et al., 2000). È anche ampiamente studiato per la

fabbricazione di scaffold tridimensionali microporosi per l'ingegneria tissutale (Aslam et al., 2017) e per la sintesi di idrogel per il rilascio controllato di farmaci (Itoh et al., 2016).

- **Industria e beni di consumo:** il PVA è un componente chiave nella produzione di fibre sintetiche come il Vinyon, note per la loro resistenza chimica e al calore, utilizzate in tessuti, corde e calzature. È impiegato anche come collante nell'industria della carta, come agente di rivestimento (coating), e nella formulazione di adesivi e resine (DeMerlis et al., 2003; Gaaz et al., 2015).
- **Settore alimentare:** le varietà di PVA parzialmente idrolizzato sono approvate per l'uso in applicazioni alimentari, in particolare come materiale per imballaggi a contatto con gli alimenti, grazie alle sue proprietà di barriera e alla sua atossicità (Abdullah et al., 2017; Aslam et al., 2017; Kumar et al., 2012; Mahanta et al., 2010).
- **Materiali avanzati e nanotecnologie:** il PVA è una matrice fondamentale per la fabbricazione di nanocompositi avanzati. Le sue eccellenti proprietà ottiche e la sua elevata rigidità dielettrica lo rendono ideale per applicazioni in dispositivi optoelettronici e sensori ottici [9, 15]. Membrane e nanofibre a base di PVA sono utilizzate in celle a combustibile, batterie, materiali filtranti e impianti a energia osmotica (Hassan et al., 2000; Mahanta et al., 2010).

2.2.3. Polietilenglicole (PEG)

Il Polietilenglicole (PEG) rappresenta un pilastro nel campo della chimica dei polimeri e delle scienze biomediche, un materiale la cui apparente semplicità strutturale nasconde una versatilità funzionale senza pari. Appartenente alla famiglia dei polieteri, il PEG è sintetizzato a partire dall'ossido di etilene, dando origine a una catena polimerica la cui

unità ripetitiva è $-(O-CH_2-CH_2)-$ (Figura 13). Questa struttura intrinsecamente idrofila, unita a una comprovata biocompatibilità e bassa tossicità, è alla base del suo successo. Tuttavia, il vero potenziale del PEG non risiede tanto nel polimero lineare di base, quanto nella sua straordinaria modificabilità chimica, che ha permesso lo sviluppo di un'ampia gamma di derivati con architetture e funzionalità su misura per applicazioni altamente specifiche (Bai & Liu, 2014; Baker et al., 2014; Zhou et al., 2013).

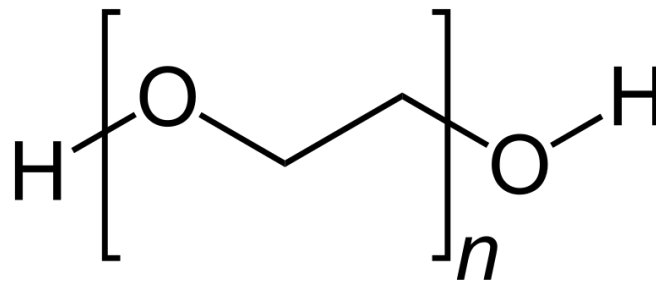


Figura 13: Struttura chimica del PEG.

Dal punto di vista chimico-fisico, i PEG si distinguono per la distribuzione del loro peso molecolare: possono essere "monodispersi", con una lunghezza di catena e un peso molecolare precisi, o, più comunemente, "polidispersi", presentando una distribuzione statistica di lunghezze. La chiave della loro immensa versatilità risiede nella capacità di funzionalizzare i gruppi terminali della catena polimerica. Questa caratteristica ha dato vita a una vera e propria "cassetta degli attrezzi" di architetture molecolari. I derivati bifunzionali, dotati di gruppi reattivi a entrambe le estremità, agiscono come "ponti" molecolari, ideali per la reticolazione (cross-linking) di altre molecole o per fungere da spaziatori (spacer) tra due entità chimiche, controllandone la distanza e l'orientamento reciproco (Bai & Liu, 2014; Baker et al., 2014; Zhou et al., 2013). Al contrario, i PEG monofunzionali sono progettati per agire come terminatori di reazione controllati, consentendo il legame a un singolo sito su una molecola target e prevenendo reazioni

indesiderate che potrebbero portare ad aggregazione o perdita di funzionalità (Hou et al., 2007; Jin et al., 2013; Proulx et al., 2013; Sun et al., 2013). L'ingegneria molecolare ha portato a strutture ancora più complesse. I PEG ramificati (*branched PEGs*), come i derivati a forma di "Y", massimizzano l'ingombro sterico attorno al punto di attacco, offrendo una schermatura più efficace con un singolo legame covalente (Resch, Moreillon, & Fischetti, 2011; Hoehlig, et al., 2013). Infine, i PEG multi-braccio (*multi-arm PEGs*), sintetizzati per etossilazione di un nucleo centrale come il pentaeritritolo, presentano molteplici "bracci" polimerici, ciascuno terminante con un gruppo reattivo. Questi derivati sono i mattoni fondamentali per la costruzione di reti tridimensionali e rappresentano il precursore d'elezione per la sintesi di idrogel (Hao et al., 2014; Maitz et al., 2013; Tong et al., 2014; Van de Manakker et al., 2008; van Dijk et al., 2010).

Il processo che sfrutta questa reattività per legare covalentemente un derivato del PEG a una molecola di interesse (proteina, farmaco, nanoparticella) è noto come PEGilazione. Si tratta di una tecnologia di piattaforma che richiede tecniche analitiche sofisticate per la caratterizzazione del prodotto finale, essenziale per garantire la conformità normativa, specialmente in ambito medico (Hutanu et al., 2014; Myers et al., 2014; Veronese et al., 2005; Zhu et al., 2014).

Il "meccanismo d'azione" del PEG è di natura prettamente funzionale e si manifesta attraverso le profonde modifiche fisico-chimiche che la PEGilazione induce sulla molecola coniugata. Una volta legata, la catena di PEG forma una "nube" idrofila, dinamica e flessibile attorno alla molecola target, creando uno "scudo molecolare" con molteplici conseguenze benefiche (Figura 14). In primo luogo, questo scudo aumenta drasticamente la solubilità in acqua e la biocompatibilità di molecole altrimenti idrofobiche o poco solubili, un vantaggio cruciale per la formulazione di farmaci (Veronese et al., 2005). In secondo luogo, e di fondamentale importanza in farmacologia,

questo scudo sterico protegge fisicamente la molecola terapeutica dalla degradazione da parte di enzimi proteolitici e ne previene la rapida eliminazione attraverso la filtrazione renale. Il risultato è un drastico aumento dell'emivita plasmatica del farmaco, che si traduce in un profilo farmacocinetico e farmacodinamico (PK/PD) notevolmente migliorato (Pang et al., 2014; Veronese et al., 2005]. Inoltre, mascherando gli epitopi antigenici sulla superficie di proteine terapeutiche, la PEGilazione ne riduce o elimina l'immunogenicità, permettendo somministrazioni ripetute senza scatenare una risposta immunitaria avversa.

Un meccanismo d'azione distinto si osserva nella formazione di idrogel. In questo caso, i PEG multi-braccio agiscono come nodi di reticolazione. Le loro catene polimeriche si legano tra loro per formare una rete tridimensionale porosa e stabile. Questa rete è in grado di assorbire e trattenere enormi quantità di acqua, dando origine a un materiale soffice e biocompatibile (Figura 14). La struttura porosa di questo idrogel può essere finemente controllata per fungere da matrice a rilascio controllato, incapsulando principi attivi e rilasciandoli gradualmente nel tempo, oppure come scaffold biocompatibile che mima la matrice extracellulare, favorendo la crescita e la rigenerazione dei tessuti (Hao et al., 2014).

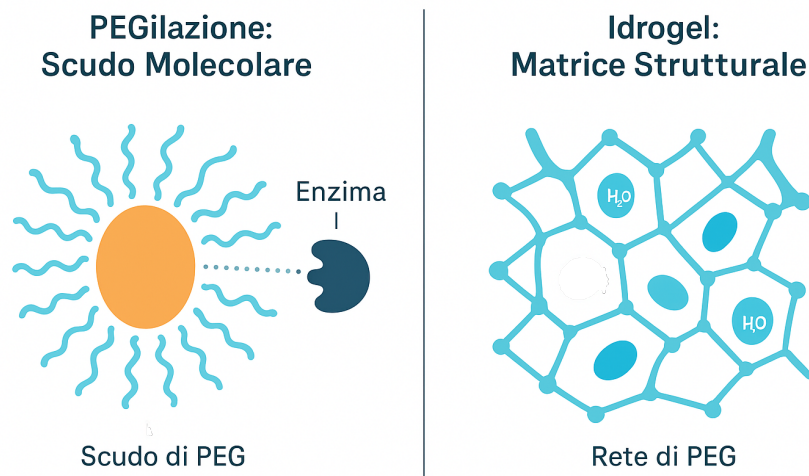


Figura 14: Meccanismi principali del polietilenglicole (PEG). A sinistra: la PEGilazione conferisce uno “scudo molecolare” attorno alla proteina, che riduce il riconoscimento e la degradazione enzimatica. A destra: il PEG reticolato forma un idrogel tridimensionale che funge da matrice strutturale, capace di intrappolare molecole d’acqua e principi attivi per il rilascio controllato.

La straordinaria versatilità del PEG si traduce in un'ampia gamma di applicazioni consolidate ed emergenti, con un'innegabile predominanza nel settore medico e farmaceutico:

- PEGilazione diretta di molecole terapeutiche: è una delle strategie più affermate per l'ottimizzazione di farmaci biologici e di sintesi. Vengono PEGilati (Nguyen et al., 2014; Moreno et al., 2014), proteine (Peng et al., 2014; Tian et al., 2014), piccole molecole come profarmaci, oligonucleotidi e persino entità più complesse come cellule o particelle virali (An et al., 2013; Chen et al., 2014; Chong et al., 2014; Gajbhiye et al., 2014; Liu et al., 2014; Saville et al., 2014; Tesfay et al., 2013; Zhang et al., 2014). L'obiettivo primario è migliorare la performance terapeutica, in particolare nell'ambito della terapia antitumorale, prolungando l'esposizione al farmaco e riducendone gli effetti collaterali.
- Veicoli per il rilascio di farmaci (Drug Delivery Systems): il PEG è un componente indispensabile per la progettazione di sistemi di trasporto nanostrutturati, dove

conferisce proprietà "stealth" (invisibilità al sistema immunitario) e ne aumenta la stabilità in circolo. Esempi includono liposomi e micelle PEGilate per il trasporto di farmaci idrofobici (Kim et al., 2014; Mei et al., 2014; Song et al., 2014), nanoparticelle polimeriche come quelle a base di PEG-PLGA per il rilascio mirato di chemioterapici (Chen et al., 2014; Kang et al., 2014), e dendrimeri PEGilati che fungono da carrier multifunzionali ad alta capacità di carico (Kong et al., 2014).

- Formazione di Idrogel per applicazioni biomediche: I derivati del PEG multi-braccio sono il gold standard per la creazione di idrogel destinati a usi avanzati, tra cui matrici per il rilascio controllato di farmaci, scaffold tridimensionali per l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa, e lo sviluppo di adesivi e sigillanti tissutali biocompatibili per la chiusura di ferite chirurgiche e non (Cencer et al., 2014).
- Modifica di superfici: la PEGilazione è una tecnica chiave per rendere le superfici di dispositivi medici, impianti e biosensori "anti-fouling". Il denso strato di PEG previene l'adesione non specifica di proteine, batteri e cellule, migliorando la biocompatibilità del materiale e la performance del dispositivo nel lungo termine (Boujema-Paterski et al., 2014; Miller et al., 2014; Petek et al., 2014; Portran, 2014; Vignaud et al., 2014).

2.3 Microplastiche e additivi plastici

L'incessante crescita della produzione industriale di polimeri sintetici ha consolidato l'inquinamento da plastica come una delle più pervasive criticità ambientali contemporanee, attirando l'attenzione di enti governativi, della comunità scientifica e

della società civile (Barrowclough e Birkbeck, 2020). Questa problematica si interconnette in modo inestricabile con altre sfide globali, quali il cambiamento climatico (Shen et al., 2020) e la diffusione di patogeni e di geni di resistenza agli antibiotici, per i quali le superfici plastiche possono fungere da substrato e veicolo. La minaccia ecologica della plastica è caratterizzata da una duplice natura, che combina un rischio fisico, di tipo particolato, con uno chimico, di tipo molecolare. Da un lato, i processi di degradazione dei macro-rifiuti generano una frammentazione progressiva in meso- (5-25 mm), micro- (< 5 mm) e nanoplastiche (<100 nm), particelle ormai ubiquitarie in ogni comparto ambientale (Stock et al., 2019). Dall'altro lato, un rischio chimico distinto deriva dal rilascio di un'ampia gamma di additivi—quali plastificanti e stabilizzanti—incorporati durante la manifattura (Yan et al., 2021; Schrank et al., 2019). Poiché tali composti non sono legati covalentemente alla matrice polimerica, essi migrano e si disperdono nell'ambiente attraverso processi di lisciviazione (Gewert et al., 2015), veicolati da impianti di trattamento delle acque reflue, deflusso superficiale e deposizione atmosferica (Karbalaei et al., 2018; Beltifa et al., 2017). L'interazione sinergica tra la componente particolata, che agisce da vettore (Ateia et al., 2020), e quella molecolare, definisce una sfida ecotossicologica di notevole complessità.

2.3.1. Polietilene

Le microplastiche non costituiscono un'entità chimica omogenea, ma una categoria eterogenea di particolato (< 5 mm). La loro composizione varia ampiamente, riflettendo i polimeri di origine, tra cui i più diffusi sono polietilene (PE), polipropilene (PP) e polistirene (PS). Nel contesto di studi ecotossicologici sperimentali, si ricorre spesso a

microplastico modello per simulare la contaminazione ambientale. Un polimero di particolare rilevanza in questo ambito è il polietilene ad altissimo peso molecolare (UHMW-PE), la cui formula chimica di base è $[-CH_2-CH_2-]_n$ (Figura 15). Nello specifico, particelle di UHMW-PE con una granulometria definita, come quella compresa tra 35 e 50 μm , sono considerate ecologicamente pertinenti poiché questa dimensione rientra nell'intervallo di particelle frequentemente riscontrate e ingerite da organismi filtratori come i bivalvi (Sfriso et al., 2020). Le proprietà fisico-chimiche di queste particelle, come l'elevata idrofobicità e talvolta la presenza di una superficie modificata (e.g., Sigma-Aldrich Cat. 434272), ne determinano la spiccata tendenza ad adsorbire contaminanti organici apolari, fungendo da substrati di concentrazione nell'ambiente acquatico (Amelia et al., 2021; Impellitteri et al., 2024).

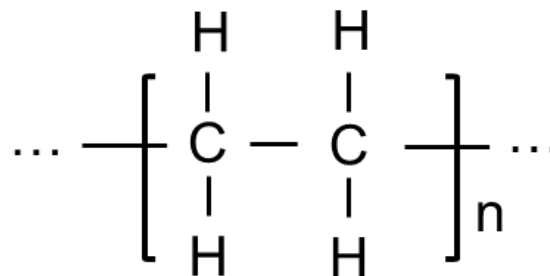


Figura 15: Struttura chimica del polietilene ad altissimo peso molecolare (UHMW-PE).

Il meccanismo d'azione delle microplastiche è bifattoriale, esplicandosi sia a livello fisico sia a livello chimico (effetto vettore). Il meccanismo fisico si manifesta a seguito dell'ingestione da parte della biota. Particelle nell'ordine dei 35-50 μm sono facilmente catturate dagli apparati filtratori, potendo indurre danni meccanici quali abrasioni, occlusioni del tratto digestivo e un ingannevole senso di sazietà, con conseguenti stati di malnutrizione e stress fisiologico. Il meccanismo chimico, noto come "effetto vettore",

assume un'importanza ecotossicologica cruciale. Funzionando come recettori idrofobici, le MP sequestrano e concentrano sulla loro superficie un'ampia gamma di inquinanti (de Sá et al., 2018). Una volta ingerite, le mutate condizioni chimico-fisiche presenti nel tratto gastrointestinale dell'organismo possono promuovere il desorbimento di tali sostanze, incrementandone la biodisponibilità e il potenziale di bioaccumulo tissutale (Pastorino et al., 2023).

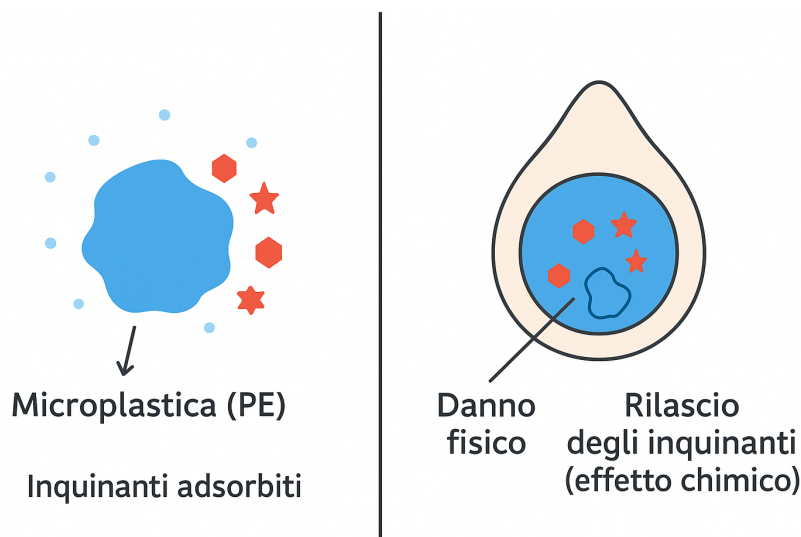


Figura 16: Meccanismo d'azione bifattoriale delle microplastiche. Le particelle di microplastica (MP) agiscono come vettori, adsorbendo contaminanti organici sulla loro superficie idrofobica nell'ambiente acquatico (a sinistra). Una volta ingerite da un organismo, le MP possono causare un danno fisico diretto (es. occlusione) e rilasciare i contaminanti accumulati, che diventano biodisponibili per i tessuti dell'ospite (a destra).

Le microplastiche di polietilene, come quelle di UHMW-PE, possono avere un'origine sia secondaria, derivando dalla frammentazione di macro-rifiuti, sia primaria. L'UHMW-PE, in particolare, non è un comune polimero da imballaggio ma un materiale ad alte prestazioni. Le sue applicazioni includono la produzione di fibre ad altissima resistenza (es. giubbotti antiproiettile, corde da arrampicata), componenti per impianti medicali (protesi d'anca e di ginocchio) e parti meccaniche soggette a elevata usura. La

sua presenza nell'ambiente può quindi derivare non solo dalla degradazione di questi manufatti specializzati, ma anche dal rilascio di particelle durante i processi produttivi e di lavorazione. Concentrazioni di MP in ambienti acquatici possono variare significativamente, da una media di 0.3 mg L⁻¹ nei fiumi (Schmidt et al., 2017) fino a superare i 40 elementi L⁻¹ in aree marine altamente inquinate (Beiras and Schönemann, 2020). Concentrazioni sperimentali, come 1 mg L⁻¹, sono pertanto considerate ambientalmente rilevanti per simulare scenari di contaminazione acuta o cronica in ecosistemi impattati (Martyniuk et al., 2023).

2.3.2. *Di(2-etilesil) tereftalato (DEHT)*

Il Di(2-etilesil) tereftalato (DEHT), noto anche come DOTP, si configura come un plastificante appartenente alla classe dei non-ftalati; esso è un diestere dell'acido tereftalico e del 2-etilesanolo (Figura 17). Strutturalmente è l'isomero dell'acido 1,4-benzendicarbossilico del più noto Di(2-etilesil) ftalato (DEHP), plastificante ftalato ampiamente regolamentato (Bui et al., 2016). Analogamente al suo isomero, il DEHT è una molecola caratterizzata da elevata idrofobicità e solubilità in acqua estremamente bassa. La sua funzione tecnologica primaria consiste nell'intercalarsi tra le catene polimeriche, tipicamente del polivinilcloruro (PVC), riducendo le forze intermolecolari e conferendo così maggiore flessibilità, processabilità e durabilità al materiale finito. La sua rapida ascesa commerciale deriva dalla sua introduzione come alternativa presuntivamente più sicura agli ftalati, a seguito della classificazione di questi ultimi come interferenti endocrini e tossici per la riproduzione (European Commission, 2006; European Commission, 2007; Mankidy et al., 2013).

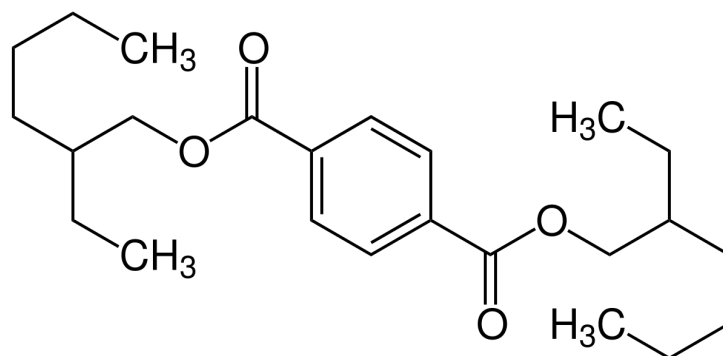


Figura 17: Struttura chimica del Di(2-etilesil) tereftalato (DEHT).

Il meccanismo d'azione primario del DEHT, in un contesto ambientale, risiede nel suo potenziale di migrazione e lisciviazione dalla matrice polimerica ospite. Giacché tali additivi non sono legati covalentemente alla struttura del polimero, sono suscettibili a diffondere verso la superficie del manufatto per essere poi rilasciati nell'ambiente esterno (acqua, suolo, aria) o in matrici a contatto (alimenti, fluidi biologici) sotto l'influenza di stress termici, chimici o meccanici (Figura 18) (Gewert et al., 2015). Sebbene non possenga le caratteristiche di una sostanza chimica persistente, la sua continua e massiccia produzione e il conseguente rilascio ne determinano una presenza costante nei comparti ambientali, configurando uno scenario di pseudo-persistenza che conduce a un'esposizione cronica per gli ecosistemi (Jebara et al., 2021). Inoltre, nonostante il suo potenziale tossico sia considerato inferiore a quello del DEHP e privo di effetti di categoria 1b, le conoscenze su altri effetti non standard, come la tossicità durante lo sviluppo precoce o l'alterazione del sistema endocrino, rimangono frammentarie e necessitano di ulteriori indagini (Bui et al., 2016).

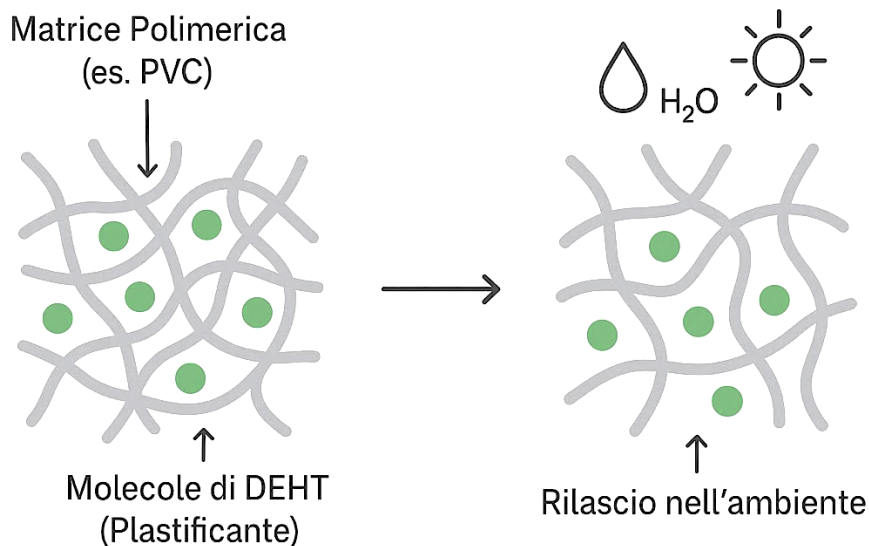


Figura 18: Meccanismo di lisciviazione (leaching) del plastificante DEHT dalla matrice polimerica. Le molecole di DEHT sono fisicamente disperse all'interno della rete polimerica (es. PVC) senza essere legate covalentemente, conferendo flessibilità al materiale (a sinistra). Sotto l'influenza di fattori fisici (calore, abrasione) e chimici (contatto con liquidi), queste molecole possono migrare verso la superficie del materiale e essere rilasciate nell'ambiente, dove diventano un contaminante biodisponibile (a destra).

Sul piano commerciale, il DEHT trova vasto impiego come plastificante primario, avendo progressivamente sostituito il DEHP in numerose applicazioni a seguito delle restrizioni normative europee. Il suo mercato è in continua espansione e oggi il DEHT, insieme agli altri tereftalati, detiene una quota di mercato del 12% nel settore dei plastificanti in Europa. Le sue applicazioni spaziano in un'ampia gamma di prodotti di consumo e industriali, tra cui articoli in PVC flessibile come giocattoli e prodotti per l'infanzia, dispositivi medicali, pavimentazioni viniliche, pellicole per imballaggi, guarnizioni, chiusure per bevande e rivestimenti isolanti per cavi elettrici (ECPI, 2018, 2019). La sua capillare diffusione in articoli di uso quotidiano assicura un percorso continuo e ubiquitario di rilascio nelle matrici ambientali, attraverso l'usura, la gestione del fine vita e i processi di lavaggio dei prodotti che lo contengono.

2.4 Residui farmaceutici: la Clorpromazina come neuroattivo di riferimento

Nell'ambito dei contaminanti emergenti, i residui farmaceutici costituiscono una delle classi più studiate e problematiche. La loro “emergenza” come minaccia ambientale è dovuta a un insieme di fattori: il loro rilascio continuo negli ecosistemi acquatici, la loro progettazione intrinseca per essere biologicamente attivi a basse concentrazioni, e una comprensione ancora incompleta dei loro effetti ecotossicologici a lungo termine (Fabbri e Franzellitti, 2016). La loro immissione avviene principalmente tramite gli effluenti di impianti di trattamento delle acque reflue e direttamente dagli scarichi domestici (Burgos-Aceves et al., 2018, 2021). Tra le varie classi farmacologiche, gli agenti antipsicotici destano particolare attenzione. Questi composti possiedono un profilo farmacologico complesso, agendo su molteplici recettori (es. dopaminergici, serotoninergici) che sono spesso evolutivamente conservati in diversi phyla, motivo per cui vengono talvolta definiti “droghe sporche” (*dirty drugs*) (Escudero et al., 2021). Questa cross-reattività rende i loro effetti su organismi non target particolarmente difficili da prevedere. La Clorpromazina (Cpz), rappresenta un caso di studio emblematico, essendo un farmaco essenziale dell'OMS (Dudley et al., 2017) il cui consumo e potenziale rilascio ambientale sono destinati a crescere.

La Clorpromazina ($C_{17}H_{19}ClN_2S$) è un composto tricyclico appartenente alla classe delle fenotiazine (Figura 19). Le sue proprietà fisico-chimiche ne determinano in modo cruciale il destino ambientale. Sebbene possa essere degradata dalla luce solare e dall'irradiazione UV in poche ore, in assenza di fotolisi mostra una notevole persistenza. È stato dimostrato che la Cpz si adsorbe fortemente ai sedimenti e al particolato sospeso, dove può permanere per settimane, fungendo da serbatoio a lungo termine dal quale

può essere rilasciata lentamente nella colonna d'acqua. Sebbene i test standard la classifichino come non facilmente biodegradabile, essa subisce processi di trasformazione abiotica e biotica che portano alla formazione di un elevato numero di prodotti di trasformazione (fino a 61 TP's documentati), i quali possono esibire una tossicità uguale o superiore a quella del composto progenitore (Trautwein e Kümmerer, 2012).

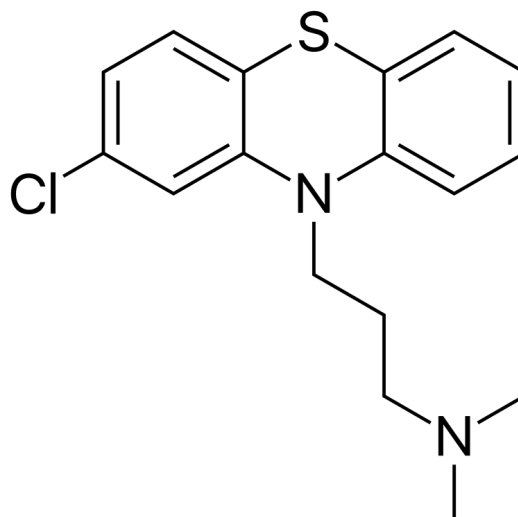


Figura 19: Struttura chimica della clorpromazina.

Il meccanismo d'azione della Clorpromazina (Cpz) è multifattoriale e si manifesta attraverso l'interazione con un ampio spettro di processi cellulari, molti dei quali sono evolutivamente conservati. La sua complessa farmacologia si esplica primariamente attraverso la sua funzione di antagonista (agente bloccante) su molteplici recettori post-sinaptici, tra cui:

- Recettori dopaminergici (D1-D4)
- Recettori serotoninergici (5-HT1, 5-HT2)

- Recettori istaminergici (H1) e adrenergici ($\alpha 1/\alpha 2$)
- Recettori muscarinici colinergici (M1/M2)

Oltre a questa attività antagonista ad ampio spettro, la Cpz agisce anche come debole inibitore presinaptico della ricaptazione della dopamina.

Accanto a questi meccanismi neuroattivi, la tossicità della Cpz è associata anche a effetti citotossici diretti. È stato dimostrato che il composto può compromettere l'integrità della membrana cellulare e innescare una risposta pro-infiammatoria, come osservato in linee cellulari epatiche (es. HepaRG) (Morgan et al., 2019). Questo suggerisce un ulteriore meccanismo di danno a livello tissutale, particolarmente rilevante per organi con funzione metabolica come il fegato dei vertebrati o la ghiandola digestiva degli invertebrati, che va oltre la sola interferenza con la segnalazione recettoriale. Questa duplice capacità, perturbare simultaneamente le vie di segnalazione neuroendocrina e indurre danno cellulare diretto (Figura 20), spiega perché i suoi effetti su organismi non-target siano così profondi e variegati. Data la sua complessa farmacodinamica a livello molecolare, la previsione degli effetti a lungo termine a concentrazioni ambientalmente rilevanti rimane una sfida scientifica di prim'ordine.

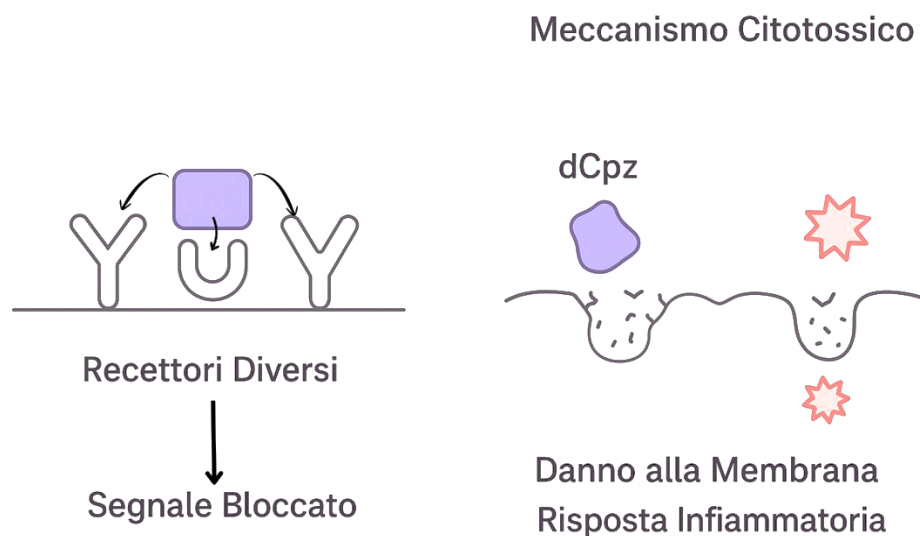


Figura 20: Doppio meccanismo d'azione ecotossicologico della Clorpromazina (Cpz). A sinistra, la Cpz agisce come "dirty drug", un antagonista ad ampio spettro che blocca simultaneamente diversi tipi di recettori cellulari, interferendo con molteplici vie di segnalazione neuroendocrina. A destra, la Cpz esercita una citotossicità diretta, compromettendo l'integrità fisica della membrana cellulare e innescando una risposta pro-infiammatoria a livello tissutale.

L'applicazione principale della Cpz è il trattamento della schizofrenia e di psicosi analoghe, con dosaggi raccomandati che possono raggiungere 400-800 mg/giorno per paziente, suggerendo un carico potenziale significativo verso i sistemi di scarico. Recentemente, il suo campo di applicazione si sta espandendo. La sua capacità di interferire con le topoisomerasi ha attratto interesse per un suo potenziale utilizzo come agente antitumorale (Lee et al., 2015), mentre la sua attività di destabilizzazione della membrana è stata esplorata per un'azione antivirale contro il SARS-CoV-2 (Stip et al., 2020). Queste nuove prospettive terapeutiche potrebbero incrementare ulteriormente il suo consumo e, di conseguenza, il suo rilascio ambientale. Le concentrazioni di Cpz rilevate in ambiente sono variabili: negli influenti degli impianti di trattamento delle acque reflue di Pechino sono stati misurati livelli tra 5 e 364 ng/L (Yuan et al., 2013), mentre in scarichi ospedalieri sono state riportate concentrazioni eccezionalmente

elevate, nell'ordine dei mg/L (Frédéric and Yves, 2014). La variabilità delle concentrazioni osservate indica diverse fonti di immissione e suggerisce l'importanza di un monitoraggio più attento del composto nell'ambiente.

2.5 Sintesi critica e lacune conoscitive

L'analisi trasversale delle classi di contaminanti emergenti presentata in questo capitolo non delinea semplicemente una collezione di minacce ambientali distinte, ma fa emergere una narrazione di conseguenze non intenzionali e di sfide ecotossicologiche interconnesse. Una sintesi critica rivela diversi principi unificanti che legano queste sostanze apparentemente disparate. Il primo è il paradosso funzionale: le proprietà chimico-fisiche che conferiscono a questi composti il loro valore commerciale sono, in quasi tutti i casi, la radice della loro pericolosità ambientale. L'efficacia ad ampio spettro dei biocidi isotiazolinoni e del conservante Quaternium-15 si traduce in una tossicità non selettiva per il microbiota acquatico. L'architettura anfifilica del Laurilsolfato di sodio (SLS), fondamentale per la sua azione detergente, è anche il meccanismo con cui destabilizza e distrugge le membrane cellulari. La complessa polifarmacologia della Clorpromazina (Cpz), ottimizzata per interagire con un'ampia gamma di recettori umani, si manifesta come un'interferenza neuroendocrina ad ampio spettro in organismi non-target a causa della conservazione evolutiva di tali recettori.

Un secondo principio unificante è la minaccia composita e secondaria. Il rischio ambientale raramente si limita al solo composto parente immesso nell'ambiente. L'esempio più emblematico è l'inquinamento da plastica, dove il polietilene (PE) agisce simultaneamente come un inquinante fisico e come un vettore chimico per additivi non legati covalentemente, come il plastificante DEHT. Questo concetto si estende oltre le

microplastiche: il Quaternium-15 agisce rilasciando formaldeide, un composto secondario con un proprio profilo di tossicità, mentre la Clorpromazina genera un vasto numero di prodotti di trasformazione (TPs) la cui identità e pericolosità sono in gran parte sconosciute. La valutazione del rischio, pertanto, non può limitarsi alla molecola originaria, ma deve considerare l'intero spettro di particelle, additivi e derivati che ne conseguono. Infine, emerge un destino ambientale convergente, descrivibile come l'effetto imbuto del ciclo idrico urbano: sostanze provenienti da fonti eterogenee (cosmetici, farmaci, materiali edili, detersivi) confluiscono negli impianti di trattamento delle acque reflue, che si dimostrano inefficaci nella loro completa rimozione. Da qui, vengono rilasciate in modo continuo negli ecosistemi acquatici, dove la loro idrofobicità le porta spesso a partizionarsi nei sedimenti, trasformandoli in serbatoi a lungo termine di contaminazione.

Da questa sintesi approfondita emergono significative e interconnesse lacune conoscitive, che non solo rappresentano la frontiera della ricerca attuale, ma definiscono con precisione la necessità e l'originalità del presente progetto di dottorato:

1. L'approccio "un composto, un effetto" è un'astrazione di laboratorio. In realtà, gli organismi acquatici sono esposti a un "cocktail" chimico a bassa concentrazione. La comprensione degli effetti non-additivi (sinergici o antagonisti) in queste miscele complesse è una delle sfide più urgenti e complesse dell'ecotossicologia moderna.
2. La pressione normativa su composti noti (es. ftalati) ha portato all'introduzione massiccia di alternative come il DEHT. Tuttavia, come evidenziato, il database ecotossicologico per queste "alternative" è pericolosamente incompleto. Per il DEHT e, in modo ancora più critico, per il Quaternium-15, mancano quasi del

tutto studi sugli effetti cronici subletali che diano una visione più completa degli effetti di queste sostanze.

3. Polimeri come il PVA e il PEG sono spesso etichettati rispettivamente come “biodegradabile” e “biocompatibile”, termini che possono essere fuorvianti in un contesto ambientale. La loro reale persistenza negli ecosistemi acquatici rappresenta un'incognita. Qual è il tasso di mineralizzazione reale del PVA in condizioni ambientali variabili? Può il PEG, data la sua stabilità e idrofilia, persistere in forma disciolta e agire come un veicolo inaspettato per altri contaminanti polari, alterandone il trasporto e la biodisponibilità?
4. La maggior parte dei dati di tossicità disponibili, specialmente per farmaci e biocidi, deriva da test acuti a concentrazioni (mg/L) che raramente si riscontrano in ambiente, se non in prossimità degli scarichi. È imperativo condurre studi a lungo termine che valutino gli effetti subletali a concentrazioni ambientalmente rilevanti (ng/L - µg/L). Solo questo tipo di studi può rivelare i rischi sottili ma potenzialmente devastanti per la salute e la stabilità degli ecosistemi acquatici.

È proprio per rispondere a queste domande aperte che si inserisce la presente tesi di dottorato. Il lavoro sperimentale che verrà esposto nei capitoli successivi è stato concepito per colmare alcune di queste lacune, investigando gli effetti di questi contaminanti emergenti, su organismi bioindicatori chiave, in condizioni che simulano un'esposizione cronica a concentrazioni ambientalmente rilevanti.

3. STRATEGIE DI MITIGAZIONE: SOLUZIONI NATURALI E BIOTECNOLOGICHE

L'emergere di contaminanti ambientali antropogenici, come biocidi, plastificanti, microplastiche e residui farmaceutici, rappresenta una delle più rilevanti sfide ecotossicologiche contemporanee. Queste sostanze, spesso persistenti, bioattive e scarsamente biodegradabili, hanno mostrato la capacità di alterare profondamente la fisiologia degli organismi acquatici, modulando vie di segnalazione cellulare, inducendo stress ossidativo e compromettendo le normali dinamiche trofiche degli ecosistemi (Banaee et al., 2023; Debnath et al., 2024). A fronte della complessità e varietà dei meccanismi tossicologici innescati dai contaminanti emergenti (CE), è emersa con forza la necessità di individuare strumenti innovativi di mitigazione, integrabili sia a scala ecosistemica sia a livello dell'organismo, e capaci di rispondere ai principi della sostenibilità ambientale.

Tra le possibili strategie, quelle fondate sul ricorso a prodotti naturali e biotecnologici stanno attirando crescente interesse scientifico, in quanto offrono soluzioni potenzialmente meno impattanti rispetto alle pratiche convenzionali di abbattimento chimico-fisico. Molti composti di origine vegetale e microbica, infatti, sono in grado di modulare efficacemente lo stress ossidativo e l'attivazione di pathway apoptotici, esercitando un ruolo protettivo sul metabolismo cellulare. Ad esempio, i polifenoli e i flavonoidi si distinguono per la loro spiccata attività scavenger nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), mentre altri metaboliti secondari interagiscono con sistemi enzimatici antiossidanti endogeni, come la superossido dismutasi e la glutatione perossidasi, rafforzandone l'efficacia (Gheldof & Engeseth, 2002; Shan et al., 2005).

Evidenze sperimentali confermano che diversi estratti vegetali o probiotici possiedono attività protettive nei confronti della tossicità indotta da contaminanti specifici. Ad esempio, *Pistacia integerrima* ha mostrato la capacità di prevenire la cardiotoxicità da bisfenolo A (BPA), modulando lo stress ossidativo e l'apoptosi attraverso vie dipendenti da p53 (Motlagh et al., 2023). Similmente, estratti di *Trigonella foenum-graecum* (fieno greco) hanno attenuato i danni testicolari indotti da BPA aumentando l'attività enzimatica antiossidante (Sirasanagandla et al., 2022) mentre probiotici complessi come il kefir hanno dimostrato un'azione protettiva nei confronti di alterazioni vascolari e ipertensione indotte da BPA in modelli animali (Debnath et al., 2024). Anche gli estratti di semi d'uva, ricchi in proantocianidine, sono stati ampiamente studiati per la loro capacità di contrastare lo stress ossidativo, l'infiammazione e la neurotossicità indotta da BPA e da altri contaminanti organici (Sánchez-González et al., 2010; Russo et al., 2015). Parallelamente, numerosi studi hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo dei prodotti naturali nel mitigare la tossicità da metalli e metalloidi. Ad esempio, estratti vegetali ricchi in composti fenolici sono stati in grado di esercitare effetti protettivi contro intossicazioni sperimentali da mercurio, attraverso la repressione dello stress ossidativo e la modulazione delle vie apoptotiche (Bhattacharya, 2018; Officioso et al., 2016). In questi casi, oltre all'attività scavenger, è stato riportato anche un potenziale ruolo chelante dei metalli, suggerendo un duplice meccanismo di azione. Analogamente, contro l'esposizione ad arsenico, è stato raccomandato l'impiego di nutraceutici e supplementazioni naturali come possibili coadiuvanti ad approcci terapeutici classici, rafforzando il concetto che una corretta alimentazione arricchita di fitocomposti bioattivi possa rappresentare una misura preventiva importante (Bjørklund et al., 2022).

L'insieme delle evidenze sperimentali finora raccolte dimostra che i composti naturali bioattivi non rappresentano semplicemente un'alternativa agli approcci remediali tradizionali, ma costituiscono la base per strategie integrate di gestione della contaminazione ambientale. La convergenza di risultati provenienti da modelli biologici diversificati indica che l'associazione sinergica di probiotici, fitocomplessi polifenolici e idrolizzati proteici possa determinare un'ampificazione dell'efficacia protettiva attraverso meccanismi di potenziamento reciproco che operano su scale biologiche multiple. Tale sinergia non si limita alla sommatoria degli effetti individuali, ma genera fenomeni emergenti di protezione sistemica che coinvolgono l'upregulation coordinata di pathway antiossidanti, la modulazione epigenetica di geni stress-responsivi e la riprogrammazione metabolica verso fenotipi cellulari più resilienti (Jindal et al., 2024; Paduraru et al., 2021).

La rilevanza di questi approcci diviene particolarmente evidente quando analizzata attraverso il prisma interpretativo del paradigma One Health, che riconosce l'interconnessione indissolubile tra salute ambientale, animale e umana. I bivalvi filtratori, in quanto organismi sentinella posizionati all'interfaccia critica tra ambiente acquatico e catena alimentare umana, rappresentano un modello paradigmatico per comprendere come interventi mirati alla protezione di questi organismi possano tradursi in benefici che si propagano attraverso i livelli trofici superiori. La riduzione del bioaccumulo di xenobiotici nei tessuti eduli dei molluschi, ottenuta attraverso la supplementazione con estratti naturali, non costituisce meramente un endpoint ecotossicologico, ma rappresenta un intervento di prevenzione primaria che intercetta il rischio sanitario alla sua origine ambientale, impedendo l'amplificazione biomagnifica lungo la catena trofica (Kheirabadi et al., 2022; Pastaki et al., 2023).

In questa prospettiva, le strategie fondate su prodotti naturali e biotecnologie microbiche si configurano come elementi costitutivi di un nuovo paradigma operativo che supera la dicotomia tradizionale tra protezione ambientale e sviluppo economico. L'implementazione di tali approcci nei sistemi di acquacoltura e nelle aree di produzione molluschi potrebbe rappresentare non solo una misura di salvaguardia ecologica, ma anche uno strumento di valorizzazione commerciale delle produzioni, attraverso la certificazione di filiere produttive che integrano principi di sostenibilità ambientale e sicurezza alimentare. La traslazione di questi principi dalla ricerca di base alle applicazioni pratiche richiede tuttavia un ripensamento dei paradigmi regolatori e gestionali, che dovranno progressivamente incorporare la complessità dei meccanismi biologici e le potenzialità offerte dalle soluzioni nature-based nell'affrontare le sfide poste dai contaminanti emergenti nel contesto del cambiamento globale.

Alla luce di queste considerazioni teoriche, il presente studio ha focalizzato l'attenzione su due matrici naturali rappresentative di approcci complementari nella mitigazione degli effetti tossici dei contaminanti emergenti. La selezione è ricaduta su composti che, pur appartenendo a categorie biologiche distinte, condividono meccanismi d'azione convergenti e potenzialità applicative concrete nell'ambito dell'acquacoltura sostenibile.

3.1. Estratto di Bergamotto (*Citrus bergamia*)

Il bergamotto (*Citrus bergamia*, Risso & Poiteau) rappresenta una delle specie agrumicole più interessanti dal punto di vista nutraceutico e fitochimico, caratterizzata da una distribuzione geografica estremamente limitata che trova nella regione calabrese il suo areale di elezione. Appartenente alla famiglia delle Rutaceae, sottofamiglia Esperidea, questa specie presenta caratteristiche morfologiche distintive, con grandi foglie ovate

verde scuro simili a quelle del limone, fiori bianchi stellati e frutti rotondi gialli. Le origini botaniche e geografiche del bergamotto rimangono tuttora oggetto di dibattito scientifico: mentre alcuni autori ipotizzano che sia originario della stessa Calabria, come risultato di mutazioni spontanee da altre specie agrumicole, altri suggeriscono una derivazione dalle Antille, dalla Grecia o dalle Isole Canarie, da dove Cristoforo Colombo potrebbe averlo importato. L'etimologia del nome sembrerebbe riconducibile alla città spagnola di Berga, da cui la pianta fu successivamente trasportata in Calabria (Rapisarda & Germanò, 2013).

Dal punto di vista tassonomico, *C. bergamia* è generalmente considerato un ibrido tra arancia amara (*C. aurantium* L.) e limone (*C. limon* L. *Burm. f.*) o, secondo interpretazioni alternative, una mutazione di quest'ultimo. Altri studiosi propongono invece una derivazione ibrida tra arancia amara e lime (*C. aurantifolia*), evidenziando la complessità delle relazioni filogenetiche all'interno del genere *Citrus* (Rapisarda & Germanò, 2013). La coltivazione del bergamotto si concentra quasi esclusivamente lungo la costa meridionale della Calabria, che rappresenta oltre il 90% della produzione mondiale, sebbene piccole piantagioni siano presenti in altri paesi mediterranei e subtropicali come Grecia, Marocco, Iran, Costa d'Avorio, Argentina e Brasile. Questa specificità geografica, determinata da condizioni pedoclimatiche uniche, ha favorito lo sviluppo di un chemiotipo particolare, ricco in metaboliti secondari che conferiscono al frutto proprietà bioattive distintive rispetto ad altri agrumi (Musolino et al., 2019). L'interesse scientifico verso il bergamotto ha subito una significativa accelerazione negli ultimi anni, parallelamente al crescente riconoscimento del ruolo che i composti polifenolici possono svolgere nella modulazione dello stress ossidativo e dell'infiammazione cronica.

La valorizzazione commerciale del bergamotto si è tradizionalmente focalizzata sull'olio essenziale, ottenuto attraverso raschiatura e spremitura a freddo della buccia, che trova ampie applicazioni nell'industria profumiera, cosmetica e alimentare per la sua fragranza intensa e caratteristica. L' sull'olio essenziale si presenta come un olio volatile di colore giallo-verdastro o giallo-brunastro, a seconda del periodo di raccolta, con sapore aromatico amaro e odore caratteristico gradevole, tanto da essere incluso nelle farmacopee ufficiali di diversi paesi. Parallelamente, il succo di bergamotto, ottenuto dall'endocarpo dopo l'estrazione dell'olio essenziale, ha acquisito crescente interesse scientifico per le sue proprietà ipolipemiche, ipoglicemizzanti, antinfiammatorie e anticancerogene, superando la sua precedente considerazione come mero sottoprodotto di scarto dell'industria degli oli essenziali (Impellizzeri et al., 2014; Mollace et al., 2011). Dal punto di vista fitochimico, il bergamotto si distingue per la presenza di un complesso pool di metaboliti bioattivi distribuiti differentemente tra le diverse matrici del frutto. La composizione chimica è stata ampiamente caratterizzata e risulta costituita da una frazione volatile (93-96% del totale) e una non volatile (4-7% del totale). La prima è dominata da monoterpeni e sesquiterpeni idrocarburi e loro derivati ossigenati, insieme ad aldeidi, alcoli ed esteri alifatici. Tra questi, il limonene rappresenta il componente principale (25-53%), seguito da significative quantità di composti ossigenati come linalolo (2-20%), linalyl acetato (15-40%), γ -terpinene e β -pinene (Costa et al., 2010; Dugo & Bonaccorsi, 2013). La frazione non volatile contiene invece pigmenti, cere, cumarine e psoraleni, tra cui il 5-metossipsoralene (bergaptene o 5-MOP) presente in concentrazioni di circa 0,2%, e la bergamottina (5-geraniossi-psoralene).

La tradizione d'uso del bergamotto nella medicina popolare italiana documenta applicazioni principalmente per febbre e malattie parassitarie, oltre che per infezioni della bocca, della pelle, del tratto respiratorio e urinario, infezioni gonococciche,

leucorrea, prurito vaginale, tonsilliti e mal di gola. Le proprietà antisetetiche e antibatteriche del bergamotto ne hanno giustificato l'impiego come agente antimicrobico per facilitare la guarigione delle ferite e in preparazioni per il trattamento dei disturbi delle vie respiratorie superiori e dell'iperidrosi (Pendino, 1998).

Gli studi preclinici hanno documentato un ampio spettro di attività biologiche che estendono significativamente il potenziale applicativo dell'estratto oltre gli usi tradizionali. L'attività antimicrobica è stata documentata contro diversi patogeni batterici e fungini, inclusi *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e dermatofiti, con il linalolo identificato come componente antibatterico più efficace (Fisher & Phillips, 2006; Romano et al., 2005). L'attività antinfiammatoria, dimostrata mediante test dell'edema plantare indotto da carrageenan nel ratto, ha evidenziato una dose efficace mediana di 0,079 ml/kg, suggerendo un potenziale terapeutico significativo (Karaca et al., 2007). Particolare interesse riveste l'attività antiproliferativa documentata su linee cellulari di neuroblastoma SH-SY5Y, dove l'olio essenziale di bergamotto ha mostrato capacità di inibire sopravvivenza e proliferazione cellulare attraverso l'attivazione di pathway multipli che conducono a morte cellulare sia necrotica che apoptotica. Le proprietà neuroprotettive rappresentano un altro aspetto di particolare rilevanza. Studi su modelli animali hanno documentato effetti ansiolitici comparabili a quelli del diazepam, con attenuazione della risposta del corticosterone allo stress acuto. A livello dell'ippocampo, infatti, induce un aumento dose-dipendente e Ca^{2+} -indipendente di aspartato, glicina, taurina, GABA e glutammato extracellulari, suggerendo un'azione modulatrice sulla trasmissione sinaptica (Amantea et al., 2009; Morrone et al., 2007). Dal punto di vista cardiovascolare, studi sperimentali hanno evidenziato che la bergamottina possiede proprietà antiaritmiche, diminuendo i cambiamenti elettrocardiografici tipici degli

spasmi delle arterie coronarie e l'insorgenza di aritmie cardiache sperimentali (Kang et al., 2013; Mollace et al., 2008). La validazione clinica di queste proprietà biologiche, sebbene ancora limitata, ha fornito evidenze incoraggianti. Dieci studi clinici hanno valutato gli effetti del bergamotto in aromaterapia per ansia e risposte allo stress, con otto che hanno riportato risultati positivi, inclusi effetti benefici su frequenza cardiaca, pressione sanguigna e risposte allo stress (Bagetta et al., 2010).

Le evidenze fin qui delineate configurano l'estratto di bergamotto come una matrice complessa in cui convergono meccanismi d'azione multipli, dalla modulazione diretta dello stress ossidativo alla regolazione di pathway neuroinfiammatori, dalla stabilizzazione delle funzioni cardiovascolari all'interferenza con processi apoptotici aberranti. Questa versatilità assume particolare rilevanza nel contesto della mitigazione degli effetti tossici dei contaminanti emergenti, che spesso agiscono attraverso meccanismi multifattoriali coinvolgenti simultaneamente stress ossidativo, disregolazione infiammatoria e alterazioni della permeabilità di membrana. L'integrazione di estratti di bergamotto in strategie di protezione degli organismi acquatici potrebbe quindi beneficiare di approcci sinergici che combinino l'azione dei fitocomplessi agrumari con altre matrici bioattive caratterizzate da meccanismi d'azione complementari.

3.2. Idrolizzati proteici derivati dalla mosca soldato nera (*Hermetia illucens*)

La crescente domanda globale di fonti proteiche alternative ha determinato una progressiva valorizzazione degli idrolizzati proteici, definiti come miscele complesse di oligopeptidi, peptidi e amminoacidi liberi prodotte attraverso processi di idrolisi proteica parziale o estensiva (Clare & Swaizgood, 2000). Il mercato mondiale degli

idrolizzati proteici è stimato raggiungere circa 160.000 tonnellate nel 2024, per un valore economico di circa 800 milioni di dollari statunitensi, a testimonianza del crescente interesse verso questi bioprodotto per le loro proprietà funzionali uniche (Firmansyah et al., 2019). Le caratteristiche biologiche degli idrolizzati proteici, incluse le attività antiossidanti, antipertensive, antimicrobiche e anticoagulanti, dipendono criticamente dalla dimensione molecolare, dalla composizione amminoacidica e dalla sequenza degli amminoacidi che ne definiscono la struttura tridimensionale (Putra et al., 2018; De Castro & Sato, 2015).

Gli insetti rappresentano il massimo esempio di biodiversità terrestre e il loro ruolo nell'ecosistema è estremamente vario, fornendo servizi ecologici essenziali come l'impollinazione di flora selvatica e colture, agendo come indicatori affidabili della qualità ambientale e fungendo da strumenti per il controllo biologico dei parassiti (Giannetto et al., 2020; Van Huis & Oonincx, 2017; Vargas et al., 2018). Dal punto di vista biotecnologico, gli insetti potrebbero rappresentare modelli innovativi e alternativi negli studi biologici, medici e ambientali, costituendo una delle migliori fonti di ispirazione per la biomimetica e lo sviluppo di innovazioni utili per migliorare la qualità della vita attraverso l'uso della biotecnologia (Firmansyah & Abduh, 2019; Zhu et al., 2020).

Tra le specie bioconvertitrici particolarmente rilevanti ci sono quelle capaci di consumare substrati organici in decomposizione durante il loro sviluppo larvale, accumulando rapidamente biomassa. In questo contesto, diversi rifiuti alimentari e sottoprodotti possono essere potenzialmente recuperati e utilizzati come nutrimento per questi insetti, anziché dover essere smaltiti in modo convenzionale, acquisendo così un nuovo valore economico. La crescente popolazione mondiale e la conseguente domanda di cibo e terreni agricoli, combinata con l'esaurimento delle risorse naturali e i cambiamenti climatici, hanno portato a una consapevolezza mondiale della necessità di nuove fonti

alternative di cibo umano e mangimi per animali (Mintah et al., 2019; Mouithys-Mickalad et al., 2020). Tradizionalmente, la produzione di idrolizzati proteici si è basata prevalentemente su substrati di origine animale convenzionale come bovini, pesce, latte e uova, oltre a fonti vegetali quali frumento e soia (Hou et al., 2017). Tuttavia, l'utilizzo di queste matrici genera una competizione diretta con le risorse alimentari destinate al consumo umano, evidenziando la necessità di identificare substrati alternativi che non interferiscano con la sicurezza alimentare globale (Pasupuleti & Demain, 2010). Considerando che un terzo della produzione agricola e alimentare globale viene sprecato e che gli insetti possono essere allevati su ex-prodotti alimentari, essi rappresentano la soluzione chiave per ridurre gli sprechi alimentari, convertendoli in prodotti di valore (Mouithys-Mickalad et al., 2020; Surendra et al., 2020).

In questo scenario, la mosca soldato nera (*Hermetia illucens*), appartenente all'ordine Diptera della famiglia Stratiomyidae, ha acquisito particolare rilevanza negli ultimi anni. Originariamente nativa delle Americhe, ora si trova in tutto il mondo nelle regioni tropicali e temperate, sebbene la sua scarsa resistenza al freddo impedisca l'invasione di regioni non native come l'Europa settentrionale (Bartosz, 2013; Celi & Gabai, 2015; Yu et al., 2017). Gli adulti non consumano altro che acqua, non si avvicinano agli esseri umani, non mordono né pungono, e non veicolano o diffondono malattie specifiche (Gallegos et al., 1999; Yu et al., 2017). Gli insetti sono comunemente consumati come alimento in molte culture del mondo. Nei paesi europei, le proteine degli insetti stanno guadagnando rapida accettazione come ingredienti proteici di alto valore nelle diete animali. L'Unione Europea ha già approvato l'inclusione di proteine di insetti nelle formulazioni di alimenti per animali domestici e mangimi per acquacoltura. Tra tutti gli insetti prodotti su scala industriale, le larve di mosca soldato nera hanno guadagnato particolare attenzione per la loro capacità di crescere su una vasta gamma di residui

organici e per la loro composizione nutrizionale unica (Diener et al., 2009; Kalová & Borkovcová, 2013). L'idoneità nutrizionale delle proteine delle larve di mosca soldato nera in acquacoltura e nelle diete per animali domestici è ben consolidata (Jucker et al., 2017; Nguyen et al., 2015; Scala et al., 2020; Sheppard, 1983; Zhou et al., 2013). L'allevamento di insetti è più eco-sostenibile, richiedendo meno risorse naturali in termini di suolo, acqua e fertilizzazione rispetto alle colture convenzionali come la soia che sono ampiamente utilizzate come mangime per il bestiame e la cui produzione compete con la produzione di cibo per il consumo umano (Marone, 2016; Van Huis & Oonincx, 2017; Van Huis et al., 2013). Inoltre, gli allevamenti di insetti emettono livelli più bassi di gas serra e ammoniaca rispetto al bestiame convenzionale (Cadinu et al., 2020; Madau et al., 2020). Gli insetti presentano anche minori vincoli di benessere animale rispetto ad altre specie animali allevate convenzionalmente e potrebbero essere utilizzati per combattere la malnutrizione nei paesi in via di sviluppo (Mather, 2019; Tao & Li, 2018; Van Huis et al., 2013). La regolamentazione europea ha recentemente autorizzato l'uso delle proteine di insetti nei mangimi per pesci allevati, limitatamente a sette specie: la mosca soldato nera, la mosca domestica comune (*Musca domestica*), il verme della farina giallo (*Tenebrio molitor*), il verme della farina minore (*Alphitobius diaperinus*), il grillo domestico (*Acheta domesticus*), il grillo bandato (*Gryllodes sigillatus*) e il grillo campestre (*Gryllus assimilis*) (Commission Regulation, 2017; Gasco et al., 2020). La peculiarità di *H. illucens* risiede nella sua straordinaria capacità di bioconversione: le larve sono in grado di nutrirsi di vari substrati organici di origine vegetale e animale, anche in decomposizione, convertendoli in biomassa larvale in soli 14 giorni in condizioni di crescita ottimali, ovvero 27°C di temperatura e 70% di umidità (Diener et al., 2009; Kalová & Borkovcová, 2013; Zhou et al., 2013). La diversità dei substrati che possono processare e l'efficienza con cui lo fanno può essere la più alta tra le mosche

(Barragán-Fonseca et al., 2018). L'ampia varietà di materiali organici di cui la mosca soldato nera è in grado di nutrirsi include letame (Sheppard, 1983), rifiuti della catena agroalimentare (Jucker et al., 2017; Scala et al., 2020), scarti di cereali distillati come malto esaurito (Ruhnke et al., 2018; Scala et al., 2020; Webster et al., 2016), e molti altri materiali organici (Nguyen et al., 2015). Le larve sono in grado di ridurre la biomassa dei rifiuti organici del cinquanta-sessanta per cento, trasformandola in biomassa ad alto contenuto proteico (Ojha, Bußler, & Schlüter, 2020). *H. illucens* non funge da vettore patogeno per l'uomo o il bestiame, caratteristica che ne facilita l'allevamento su larga scala senza significativi rischi sanitari (Oliveira et al., 2015). Gli insetti presentano pochi rischi riguardo alla trasmissione di infezioni e zoonosi, essendo tassonomicamente distanti dalle specie comunemente allevate (Almeida et al., 2015). Tuttavia, gli insetti sono potenziali vettori di patogeni medicamente rilevanti e il rischio di infezioni potrebbe aumentare con l'uso improprio di prodotti di scarto e con la manipolazione non igienica degli insetti (Firmansyah et al., 2019). Questo non si verifica nella mosca soldato nera, poiché lo stadio adulto non possiede apparato boccale funzionante e, quindi, non è associato a trasmissioni di malattie, né all'accumulo di pesticidi o micotossine (Li & Wu, 2020; Makkar et al., 2014; Rojas & Stein, 2015).

Dal punto di vista nutrizionale, la composizione proteica e lipidica delle larve di mosca soldato nera è influenzata da ciò che consumano ma tutti i valori indicano consistentemente le larve come una buona fonte di proteine e lipidi, sia per esemplari allevati che selvatici (Zeiger et al., 2017). La farina di larve contiene una quantità di calcio superiore di oltre un ordine di grandezza rispetto alla maggior parte degli altri insetti, offrendo così un rilevante vantaggio nutrizionale (Finke, 2013; Miglietta, De Leo, Ruberti, & Massari, 2015; Spranghers et al., 2017). Alcuni peptidi a catena corta e amminoacidi liberi sono noti per possedere attività antiossidante. Queste molecole

possono attivamente neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno e i radicali liberi. Studi su preparazioni ottenute dall'idrolisi di proteine di *Amphiacusta annulipes*, *Bombyx mori*, *Grylloides sigillatus*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Tenebrio molitor* e *Zophobas morio* hanno indicato il forte potenziale antiossidante degli idrolizzati proteici di insetti (Elias, Kellerby, & Decker, 2008; Vercruyssen, Smagghe, Herregods, & Van Camp, 2005; Zielińska, Baraniak, & Karaś, 2017a; Zielińska, Baraniak, & Karaś, 2018; Zielińska, Karaś, & Jakubczyk, 2017b). Sebbene gli antiossidanti di origine vegetale siano incoraggiati e utilizzati, stanno sorgendo problemi tecnologici dovuti alla diversità nella composizione proteica e nelle matrici. Gli insetti, inclusa la mosca soldato nera, rappresentano una biotecnologia preziosa che incorpora i nutrienti nei loro corpi durante la bioconversione di matrici organiche, riducendo al contempo la quantità di materiale di scarto e generando una biomassa più omogenea e di valore (Hanboonsong et al., 2010). È degno di nota che questa "bioraffineria indiretta" attraverso gli insetti possa generare antiossidanti di origine animale, principalmente proteine e peptidi, con rilevante valore nutrizionale rispetto ai composti fenolici, carotenoidi e vitamine derivati dalle piante (Yen et al., 2009).

Nonostante il grande potenziale delle proteine di larve di mosca soldato nera come fonte proteica sostenibile e alternativa alla farina di pesce nei mangimi per il settore dell'acquacoltura, pochi dati hanno investigato la capacità delle proteine di *H. illucens* di fornire fonti derivate da proteine di valore con attività biologica. La ricerca sistematica sulla produzione di idrolizzati proteici da larve di mosca soldato nera rimane tuttavia limitata, rappresentando un'area di investigazione con notevoli potenzialità per sviluppi futuri. L'integrazione di questi bioprodotto in strategie di mitigazione degli effetti tossici dei contaminanti emergenti potrebbe beneficiare delle proprietà antiossidanti documentate, della capacità di neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno e dell'elevato

contenuto in amminoacidi essenziali. Questi caratteri biologici, combinati con la sostenibilità ambientale del processo produttivo e la valorizzazione di sottoprodotti organici, configurano gli idrolizzati proteici di *H. illucens* come una risorsa promettente per lo sviluppo di approcci innovativi di protezione degli organismi acquatici esposti a xenobiotici, con potenziali ricadute significative sia in ambito ecotossicologico che nell'ottimizzazione delle pratiche di acquacoltura sostenibile.

3.4 Impiego di bioprodotto naturali e prospettive applicative

L'emergere di contaminanti chimici sempre più diversificati e persistenti negli ecosistemi acquatici ha reso evidente la necessità di sviluppare approcci di mitigazione che vadano oltre le strategie convenzionali di trattamento. In questo contesto, l'impiego di prodotti naturali bioattivi si configura come una risposta innovativa che combina efficacia biologica e sostenibilità ambientale, offrendo soluzioni che possono essere integrate in sistemi di gestione ecologica più ampi e resilienti.

La selezione di estratti di *C. bergamia* e idrolizzati proteici di *H. illucens* come matrici di studio riflette una strategia che valorizza la disponibilità di sottoprodotti industriali e agricoli, trasformandoli in risorse bioattive ad alto valore aggiunto. Il bergamotto, con la sua ricchezza in composti polifenolici e terpenici, rappresenta un esempio di come l'industria agroalimentare mediterranea possa contribuire alla produzione di bioprodotto funzionali, mentre gli idrolizzati proteici derivati dalla mosca soldato nera esemplificano le potenzialità della zootecnia alternativa basata su insetti nell'offrire soluzioni proteiche innovative e sostenibili. L'integrazione di questi approcci in strategie di biorisanamento si basa sul riconoscimento che la complessità degli scenari di contaminazione ambientale richiede risposte altrettanto articolate, capaci di agire su

molteplici livelli biologici e attraverso meccanismi d'azione diversificati. La complementarità tra antiossidanti vegetali e peptidi bioattivi di origine animale offre la possibilità di sviluppare sistemi protettivi che massimizzino la resilienza degli organismi acquatici esposti a stress chimici multipli e simultanei. Le prospettive applicative di questi approcci si estendono dalla formulazione di additivi funzionali per mangimi impiegati in acquacoltura, allo sviluppo di tecnologie di trattamento delle acque. In questa visione, gli organismi filtratori come i bivalvi non rappresentano solamente bioindicatori passivi della qualità ambientale, ma diventano elementi attivi di strategie di mitigazione che sfruttano la loro capacità di bioaccumulo e metabolizzazione per ridurre il carico tossico negli ecosistemi. L'approccio *One Health* che sottende queste strategie riconosce l'interconnessione tra salute ambientale, animale e umana, configurando il biorisanamento integrato come strumento di prevenzione primaria che intercetta i rischi sanitari alla loro origine ecologica. La riduzione della tossicità ambientale attraverso l'impiego di prodotti naturali contribuisce così non solo alla protezione degli ecosistemi, ma anche alla sicurezza delle produzioni ittiche e, indirettamente, alla salute pubblica.

Le potenzialità teoriche delineate in questo capitolo trovano la loro validazione sperimentale nelle investigazioni che seguono, dove l'efficacia protettiva di estratti di bergamotto e idrolizzati proteici di *H. illucens* viene valutata attraverso approcci metodologici specificamente progettati per caratterizzare la risposta biologica di organismi modello esposti a contaminanti emergenti rappresentativi. I risultati di queste investigazioni forniranno le evidenze empiriche necessarie per tradurre i principi teorici del biorisanamento integrato in applicazioni pratiche, contribuendo allo sviluppo di tecnologie sostenibili per la gestione della qualità ambientale negli ecosistemi acquatici.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Organismi modello e protocolli di stabulazione

4.1.1. *M. galloprovincialis*: acquisizione e condizioni di mantenimento

Per ciascun esperimento sono stati impiegati lotti di 150-200 esemplari di *M. galloprovincialis* acquisiti presso l'azienda di mitilicoltura FARAU S.r.l. (Frutti di Mare, Messina), situata nell'area del Lago Faro all'interno della riserva naturale orientata della Laguna di Capo Peloro. Gli organismi, caratterizzati da una lunghezza media della conchiglia di $5,5 \pm 0,5$ cm, sono stati trasportati in contenitori isotermici riempiti con acqua del sito di origine per minimizzare lo stress durante il trasferimento.

Una volta giunti presso il Laboratorio di Ecofisiologia Animale dell'Università di Messina, gli esemplari sono stati sottoposti a valutazione morfometrica per verificare l'omogeneità del campione e selezionare individui in condizioni sanitarie ottimali. La selezione è stata basata sull'integrità delle valve, sull'assenza di epibionti e sulla pronta risposta di chiusura agli stimoli meccanici. Gli organismi sono stati distribuiti casualmente in acquari di vetro da 30 litri, seguendo un disegno sperimentale che prevedeva due vasche replicate per ciascuna condizione da testare. Gli acquari sono stati riempiti con 20-30 litri di acqua salmastra filtrata proveniente dal Lago Faro, sottoposta a filtrazione meccanica per rimuovere particelle grossolane e potenziali patogeni, mantenendo la componente nutritiva naturale. Il protocollo di acclimatazione ha previsto un periodo di adattamento di sette giorni in condizioni ambientali rigorosamente controllate. Durante tutta la durata dell'esperimento i bivalvi sono stati mantenuti a concentrazioni standard di salinità e la temperatura è stata stabilizzata a

18,0 ± 0,5°C. Il pH è stato mantenuto a 7,5 ± 0,1 mediante controllo quotidiano con pHmetro digitale calibrato. L'ossigenazione è stata garantita da un sistema di areazione continua costituito da pompe a membrana collegate a diffusori porosi, mantenendo la concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 6 mg/L. I ricambi idrici sono stati effettuati ogni due giorni, rinnovando il 50% del volume totale con acqua filtrata della stessa provenienza, arricchita naturalmente di particelle nutritive. Il fotoperiodo è stato impostato per simulare le condizioni naturali con alternanza luce/buio di 16:8 ore.

4.1.2. *P. imbricata*: acquisizione e condizioni di mantenimento

Trenta esemplari di *P. imbricata* sono stati raccolti presso il canale "Due Torri", zona di collegamento naturale tra il Lago Grande di Ganzirri e il Mar Ionio, situata nella riserva naturale orientata della Laguna di Capo Peloro. La raccolta è stata effettuata mediante immersione diretta, selezionando manualmente organismi di dimensioni omogenee e in buone condizioni di salute, verificate attraverso l'osservazione della risposta di chiusura delle valve agli stimoli meccanici. Il trasporto dal sito di raccolta al laboratorio è stato completato in tempi ridotti (inferiori a 2 ore) utilizzando contenitori termici a tenuta stagna riempiti con acqua marina del sito di origine. La temperatura è stata mantenuta costante mediante ghiaccio e l'ossigenazione è stata garantita attraverso sistemi di areazione portatili.

Una volta in laboratorio, tutti gli esemplari sono stati sottoposti a caratterizzazione morfometrica dettagliata utilizzando un calibro digitale con precisione ± 0,01 mm. Le misurazioni hanno riguardato tre parametri: lunghezza massima della conchiglia, altezza massima e ampiezza massima della conchiglia chiusa. I risultati morfometrici hanno evidenziato una lunghezza media di 7,0 ± 0,2 cm (range: 6,4-7,8 cm), un'altezza

media di $6,8 \pm 0,2$ cm (range: 6,2-7,4 cm) e un'ampiezza media di $2,3 \pm 0,05$ cm (range: 2,1-2,6 cm). Gli esemplari sono stati alloggiati in un singolo acquario di grande capacità (300 litri) riempito completamente con acqua marina prelevata dal medesimo sito di raccolta degli organismi. Prima dell'avvio delle procedure sperimentali, è stato osservato un periodo di acclimatazione di cinque giorni in condizioni rigorosamente controllate.

I parametri chimico-fisici sono stati mantenuti costanti durante tutto il periodo di stabulazione: temperatura a $16,8 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e pH a $7,6 \pm 0,01$.

L'aerazione dell'acqua è stata mantenuta costante mediante sistema di diffusione dell'aria con pompe a membrana e diffusori porosi. Il fotoperiodo è stato regolato su un ciclo di 12:12 ore luce/buio per riprodurre le condizioni naturali del sito di provenienza.

Durante il periodo di acclimatazione non è stata fornita alimentazione artificiale, poiché l'acqua marina naturale conteneva particelle nutritive sufficienti per il sostentamento degli organismi. I ricambi idrici sono stati limitati al minimo indispensabile per evitare stress aggiuntivi, rinnovando solo il 20% del volume ogni tre giorni con acqua marina fresca del sito di origine.

4.2 Preparazione delle soluzioni stock e concentrazioni sperimentali

La selezione delle sostanze oggetto di indagine nel presente studio è stata effettuata attraverso un'analisi critica e sistematica della letteratura scientifica disponibile, applicando criteri di rilevanza ambientale e tossicologica specifici per i contaminanti emergenti. I parametri considerati per la scelta dei composti da testare hanno incluso: l'elevata frequenza di rinvenimento negli ambienti acquatici documentata in studi di monitoraggio ambientale, l'incremento delle concentrazioni rilevate negli ecosistemi di transizione dovuto alle diverse fonti di contaminazione diffusa, la persistenza

ambientale e la limitata efficacia dei processi naturali di degradazione, la carenza di dati ecotossicologici relativi agli effetti sugli organismi acquatici autoctoni e la recente identificazione di questi composti come prioritari per la ricerca ambientale. La metodologia di selezione ha inoltre considerato la rappresentatività delle diverse classi chimiche di contaminanti emergenti, privilegiando sostanze caratterizzate da differenti meccanismi d'azione, proprietà chimico-fisiche e vie di esposizione.

Particolare attenzione è stata rivolta alla scelta di composti per i quali esistevano evidenze preliminari di potenziali effetti biologici, ma con lacune conoscitive significative riguardo ai meccanismi di tossicità a livello cellulare e subcellulare negli organismi marini. Questo approccio ha consentito di identificare un panel rappresentativo di contaminanti emergenti che riflettesse la complessità delle miscele ambientali reali, garantendo una valutazione multitarget dei rischi associati all'esposizione a queste sostanze negli ecosistemi acquatici di transizione del Mediterraneo.

Tutti i reagenti chimici utilizzati nel presente studio sono stati acquisiti da fornitori certificati e di riconosciuta affidabilità internazionale, garantendo purezza e qualità *analytical grade*. Le soluzioni stock sono state preparate utilizzando acqua distillata ultrapura o acqua marina filtrata fornita direttamente dall'allevamento di miticoltura, sottoposta a filtrazione meccanica. La qualità dell'acqua marina è stata verificata mediante analisi chimico-fisiche preliminari (pH, salinità, temperatura) per assicurare condizioni standardizzate in tutti gli esperimenti.

4.2.1. *Benzisothiazolinone (BIT)*

Il Benzisothiazolinone appartiene alla famiglia degli isotiazolinoni e trova estensiva applicazione come conservante biocida. Le concentrazioni e i tempi di esposizione sono stati determinati sulla base di una revisione sistematica della letteratura scientifica disponibile (Paijens et al., 2020; Wick et al., 2010; Multisanti et al., 2023; Prego-Faraldo et al., 2015) e di dati di occorrenza ambientale. Le esposizioni in vitro hanno previsto due concentrazioni sperimentali: B1 ($0,03 \mu\text{g L}^{-1}$), B2 ($0,3 \mu\text{g L}^{-1}$) e controlli non trattati (CTR), con tempi di esposizione di 1 e 3 ore. Le soluzioni stock sono state preparate in soluzione fisiologica salina sterile (NaCl 0,9%, osmolarità 300 mOsm/kg). Il pH delle soluzioni è stato verificato e mantenuto a $7,8 \pm 0,1$ per simulare le condizioni fisiologiche marine. I campioni di emolinfa, ottenuti mediante centrifugazione ($400 \times g$, 10 min, 4°C), sono stati risospesi in soluzione fisiologica e successivamente incubati con le concentrazioni sperimentali a temperatura controllata ($18 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Il protocollo sperimentale ha previsto campionamenti a 1 e 3 ore di esposizione, con tutti i gruppi sperimentali analizzati in triplicato biologico. Per le analisi su cellule della ghiandola digestiva, la procedura di isolamento cellulare ha preceduto l'incubazione con le concentrazioni sperimentali secondo il medesimo protocollo temporale.

4.2.2. *Ottile isotiazolinone (OIT)*

L'ottile isotiazolinone rappresenta una classe di biocidi isotiazolinonici ampiamente impiegata in formulazioni industriali, tuttavia caratterizzata da una significativa lacuna di dati relativi agli effetti subletali su organismi acquatici non-target. Le concentrazioni sperimentali sono state selezionate sulla base di modelli di esposizione ambientale

predittivi e di dati di monitoraggio ambientale disponibili in letteratura, pur limitati: CTRL (controllo non esposto), E1 (0,01 mg L⁻¹) ed E2 (0,1 mg L⁻¹). La sostanza (purezza ≥99%) è stata solubilizzata direttamente in acqua marina filtrata mediante agitazione magnetica a temperatura controllata (18±1°C) fino a completa dissoluzione. Le soluzioni stock (concentrazione 100x) sono state preparate giornalmente e diluite alle concentrazioni finali immediatamente prima della somministrazione per minimizzare potenziali fenomeni di degradazione.

4.2.3. Metilcloroisotiazolinone (CMIT) e Idrolizzati proteici da *Hermetia illucens* (BPHs)

CMIT è un biocida ampiamente utilizzato per le sue proprietà conservanti. Le esposizioni prevedevano una concentrazione di 0,01 mg/L. La soluzione stock è stata preparata disciogliendo CMIT in acqua distillata sterile per ottenere una concentrazione di 1 mg/L. Questa soluzione madre è stata conservata a 4°C e diluita nelle concentrazioni finali immediatamente prima dell'uso per mantenere la stabilità chimica. Il pH della soluzione è stato mantenuto a 7,5 ± 0,2. Gli acquari sono stati mantenuti a 18,2 ± 0,3°C per simulare le condizioni ambientali. Gli idrolizzati proteici di *H. illucens* sono stati studiati per le loro potenzialità come alternativi sostenibili nelle formulazioni alimentari per organismi acquatici. Una concentrazione sperimentale di 0,5 mg/mL è stata utilizzata nel trattamento. Il prodotto è stato solubilizzato in acqua distillata per ottenere una soluzione stock di 10 mg/mL, preparata e conservata a 4°C. Le soluzioni finali sono state diluite giornalmente per garantire freschezza e stabilità prima dell'introduzione negli acquari. I trattamenti sono stati effettuati secondo il seguente schema:

- CTR: Gruppi di controllo senza esposizione.

- CMIT: Esposizione a una concentrazione di CMIT di 0,01 mg/L.
- BPHs: Esposizione a una concentrazione di BPHs di 0,5 mg/mL.
- MIX: Esposizione combinata a CMIT (0,01 mg/L) e BPHs (0,5 mg/mL).

Tutti i gruppi sperimentali sono stati analizzati in triplicato biologico.

4.2.4. Quaternium-15

L'esametilentetrammina cloroalil cloruro (quaternium-15) rappresenta un composto di ammonio quaternario ampiamente utilizzato come conservante antimicrobico, con documentata persistenza ambientale e potenziale bioaccumulo. Il reagente è stato fornito da Alfa Aesar GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Germania) sotto forma di scaglie, successivamente ridotte meccanicamente a polvere fine mediante mortaio e pestello sterilizzati per facilitare la dissoluzione in soluzione stock preparata con acqua marina. Per gli esperimenti con *M. galloprovincialis*, i gruppi sperimentali hanno compreso: CTR (controllo), E1 (0,5 mg L⁻¹) ed E2 (1,0 mg L⁻¹). Per *P. imbricata*, le esposizioni in vitro di emociti isolati sono state condotte a temperatura controllata (18±0,5°C) per 24 ore con concentrazioni: CTR (controllo non trattato), Q1 (0,1 mg L⁻¹) e Q2 (1,0 mg L⁻¹), e tempi di campionamento a 30 min, 60 min e 24 ore. Le concentrazioni sono state selezionate sulla base di studi precedenti (Arrigo et al., 2023; Faggio et al., 2016; Multisanti et al., 2023) e di dati di occorrenza ambientale per composti di ammonio quaternario (Mohapatra et al., 2023). Tutti i gruppi sperimentali sono stati analizzati in triplicato biologico.

4.2.5. Laurilsolfato di sodio (SLS) e olio essenziale di bergamotto (BRG)

L'esperimento con il laurilsolfato di sodio e l'olio essenziale di bergamotto è stato progettato per valutare gli effetti singoli e combinati di un tensioattivo anionico e di un estratto naturale con proprietà antiossidanti, rappresentando un modello di studio per l'interazione tra contaminanti di sintesi e composti bioattivi naturali. I gruppi sperimentali hanno incluso: CTR (controllo non trattato), SLS (0,010 mg L⁻¹), BRG (5,0 mg L⁻¹) e MIX (combinazione SLS 0,010 mg L⁻¹ + BRG 5,0 mg L⁻¹), con esposizione cronica di 14 giorni. Le soluzioni stock sono state preparate separatamente in acqua marina filtrata. L'olio essenziale di bergamotto è stato precedentemente caratterizzato per determinare il profilo dei composti attivi principali. La soluzione MIX è stata preparata mediante miscelazione delle soluzioni stock individuali, garantendo l'omogeneità mediante agitazione magnetica prolungata. La stabilità dell'emulsione è stata monitorata visivamente durante tutto il periodo sperimentale.

4.2.6. Alcol Polivinilico (PVA)

L'alcol polivinilico costituisce un polimero sintetico di crescente interesse tossicologico data la sua ampia diffusione commerciale e la persistenza negli ambienti acquatici. Il reagente utilizzato (CAS 9002-89-5, Sigma-Aldrich, Repubblica Ceca) presentava peso molecolare 9.000-10.000 Da, grado di idrolisi 80% e aspetto di cristalli bianchi/off-white. Gli organismi sono stati distribuiti in sei acquari (due repliche per condizione) secondo un disegno completamente randomizzato, con gruppi sperimentali: CTRL (controllo), PVA1 (0,1 mg L⁻¹) e PVA2 (10 mg L⁻¹). L'esposizione è stata condotta per 14 giorni in condizioni controllate (salinità: 31,79±0,2‰; temperatura: 18,5±0,5°C; pH: 7,5±0,1). La

selezione delle concentrazioni è stata basata su studi precedenti condotti su *Paracentrotus lividus* (Alonso-López et al., 2021) e su modelli vertebrati (Zicarelli et al., 2024c), rappresentando un range di concentrazioni che copre sia livelli potenzialmente rilevanti dal punto di vista ambientale sia concentrazioni sperimentali necessarie per l'identificazione di effetti biologici significativi. Le soluzioni sono state preparate sciogliendo la polvere direttamente in acqua salmastra senza l'utilizzo di solventi.

4.2.7. Polietilenglicole (PEG)

Il polietilenglicole rappresenta una delle classi di polimeri sintetici più diffuse in applicazioni industriali e farmaceutiche, con crescente rilevanza come contaminante emergente negli ecosistemi acquatici. Il reagente utilizzato (CAS 25322-68-3, peso molecolare 8.000 Da, purezza $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Praga, Repubblica Ceca) è stato selezionato sulla base di studi precedenti che hanno dimostrato una maggiore biodisponibilità e tossicità per PEG di dimensioni intermedie. I gruppi sperimentali hanno compreso: CTRL (0 mg L^{-1}), PEG1 ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e PEG2 (10 mg L^{-1}). In assenza di dati definitivi sulle concentrazioni ambientali di PEG negli ecosistemi marini, le concentrazioni sperimentali sono state selezionate sulla base di studi ecotossicologici precedenti (Hatami et al., 2019; Multisanti et al., 2024) e di stime conservative derivanti da modelli di rilascio ambientale. Il polimero, sotto forma di polvere cristallina, è stato disciolto in acqua salmastra mediante agitazione magnetica a temperatura ambiente fino a completa solubilizzazione.

4.2.8. Polietilene (MPs) e caffeina

Questo studio ha valutato gli effetti singoli e potenziali interazioni di microplastiche e caffeina, rappresentando due classi di contaminanti emergenti di rilevanza globale negli ecosistemi acquatici. Le microplastiche consistevano in polietilene in polvere ad altissimo peso molecolare (Sigma-Aldrich, codice 434.272) con dimensioni 35-50 μm e superficie modificata. I gruppi sperimentali hanno incluso: CTR (controllo non trattato), MPs (1,0 mg L^{-1} , corrispondente a 15-70 particelle L^{-1}) e Caffeina (20 $\mu\text{g L}^{-1}$). La selezione della concentrazione di caffeina è stata basata su un'estensiva revisione della letteratura relativa alla contaminazione di acque superficiali, con concentrazioni documentate tra 0,05-59,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ in diverse matrici acquatiche europee (Shulan et al., 2020; Vystavna, 2011; Wilkinson et al., 2022). La concentrazione di microplastiche selezionata riflette livelli intermedi rispetto al range documentato in ambienti naturali, considerando concentrazioni medie globali di 0,3 mg L^{-1} in fiumi (Schmidt et al., 2017) e fino a 9,09 mg L^{-1} in zone umide (Lasee et al., 2017). Le microplastiche sono state disperse in acqua marina mediante combinazione di agitazione magnetica (30 min) e sonicazione (10 min, 40 kHz) per garantire l'omogeneità della sospensione, mentre la caffeina è stata solubilizzata direttamente in acqua marina filtrata.

4.2.9. Di(2-etilesil) tereftalato (DEHT)

Il di(2-etilesil) tereftalato rappresenta un plastificante alternativo agli ftalati tradizionali, caratterizzato da crescente utilizzo industriale e conseguente rilascio negli ecosistemi acquatici. I gruppi sperimentali sono stati esposti separatamente a due diverse concentrazioni di DEHT (purezza $\geq 96\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania): DEHT1

(1 mg L⁻¹, concentrazione ambientale, EC) e DEHT100 (100 mg L⁻¹, 100×EC), mentre i gruppi di controllo non hanno ricevuto alcun trattamento di esposizione. La concentrazione di DEHT di 1 mg L⁻¹ è stata selezionata sulla base dei livelli di DEHT recentemente rilevati nelle acque marine dell'area mediterranea (0,78 mg L⁻¹, Jebara et al., 2021; 0,68-1,21 mg L⁻¹, Gugliandolo et al., 2020), mentre la concentrazione di 100 mg L⁻¹, corrispondente a 100 volte la concentrazione ambientale, è stata considerata in relazione a lavori precedenti (Stara et al., 2021). Questa concentrazione elevata è stata inclusa per identificare potenziali effetti dose-dipendenti e per confrontare le risposte biologiche lungo un gradiente di esposizione realistico. L'esposizione di 14 giorni è stata scelta considerando che il DEHT non è un plastificante altamente persistente e bioaccumulativo (Bui et al., 2016) e sulla base di studi precedenti (Martyniuk et al., 2023). La determinazione del contenuto di DEHT nei mitili sperimentali e di controllo, così come nell'acqua salata, è stata eseguita secondo il metodo proposto da Jebara et al. (2021). Brevemente, 0,1 g di ogni campione polverizzato è stato addizionato con una quantità nota di standard deuterato (DEHT-d4 in nonano, 100 µg mL⁻¹, Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA) e miscelato con 0,2 g di solfato di sodio anidro (Sigma-Aldrich) e 0,4 g di sorbente solido silicato di magnesio (Florisil®, 60-100 mesh, polvere grossolana, Fluka, Sigma-Aldrich). La miscela ottenuta è stata aggiunta sulla sommità di una pipetta Pasteur di vetro precedentemente preparata con 0,1 g di Florisil e lana di vetro, e successivamente sigillata nella parte superiore con lana di vetro aggiuntiva. L'estratto è stato eluito con una soluzione di n-esano:acetone (1:1 v/v; grado >99,9%, Sigma-Aldrich) ed evaporato a secchezza mediante evaporatore rotativo (Buchi V700, BUCHI Labortechnik AG, Svizzera). Il DEHT nei campioni di acqua salata è stato determinato utilizzando una cartuccia C18 (Supelclean C18, 3 mL, 500 mg sorbente, Supelco), precedentemente condizionata con 5 mL di acetato di etile (grado >99,9%,

Sigma-Aldrich) e 5 mL di metanolo (grado >99,9%, Sigma-Aldrich). Dopo il passaggio dei campioni, la cartuccia è stata lavata con 4 mL di acqua deionizzata (Sigma-Aldrich), seguita da 6 mL di una soluzione metanolo:acqua (35%, v/v). Il DEHT è stato eluito con 5 mL di acetato di etile ed evaporato a secchezza mediante evaporatore rotativo (Buchi V700, BUCHI Labortechnik AG, Svizzera).

4.2.10. Clorpromazina (Cpz)

La clorpromazina rappresenta un farmaco antipsicotico di prima generazione, classificato come contaminante farmaceutico emergente con documentata persistenza ambientale e attività biologica a concentrazioni tracce. Due concentrazioni sono state selezionate per questo studio: Cpz1 (12 ng L⁻¹), rappresentativa di livelli ambientali realistici basata su dati di monitoraggio in effluenti di impianti di trattamento (Baresel et al., 2015) e acque superficiali (Yuan et al., 2013), e Cpz2 (12 µg L⁻¹). Gli studi preliminari hanno previsto il monitoraggio delle concentrazioni di Cpz a intervalli regolari (0, 6, 12, 24, 48 ore) mediante analisi HPLC-MS/MS, confermando una stabilità >95% nell'arco temporale sperimentale. Le soluzioni stock sono state preparate in acqua marina filtrata e utilizzate per esposizioni croniche di 14 giorni, con gruppo di controllo non trattato (C-group) analizzato in parallelo. Le soluzioni sono state conservate al buio a 4°C per minimizzare la fotodegradazione e rinnovate ogni 48 ore per mantenere concentrazioni costanti durante tutto il periodo di esposizione.

4.3 Somministrazione di nutraceutici e bioprodoti

Oltre ai contaminanti ambientali presi in esame, sono stati valutati anche gli effetti di due differenti categorie di prodotti naturali e biotecnologici, connotati da potenziali proprietà benefiche: gli estratti di bergamotto (*C. bergamia*) e gli idrolizzati proteici ottenuti dalla larva della mosca soldato nera (*H. illucens*).

Gli estratti di bergamotto provengono dalla cultivar “Castagnaro”, raccolta nel territorio di Melito di Porto Salvo (Reggio Calabria, Italia) nel dicembre 2023, e successivamente processati secondo metodiche già validate in letteratura (Russo et al., 2021). Le bucce sono state sottoposte a essiccazione a bassa temperatura (25 °C per 48 h), macinate fino a ottenere una polvere fine e infine trattate con estrazione a solvente in ultrasuoni. Dopo evaporazione e concentrazione degli estratti, questi sono stati ricostituiti in una soluzione acqua/etanolo (8:2, v/v) e ulteriormente diluiti. La somministrazione negli acquari sperimentali è avvenuta secondo uno schema già validato da analisi preliminari, che ha previsto una concentrazione finale di 5 mg L⁻¹. Tale valore è stato scelto in base all'evidenza di un'attività antiossidante significativa, documentata da studi in vitro e in vivo, ma priva di effetti tossici verso i mitili anche dopo esposizioni croniche.

Inoltre, sono stati impiegati idrolizzati proteici derivati da *H. illucens*, noti per la loro composizione in peptidi bioattivi con attività antiossidanti e immunomodulatorie. La concentrazione scelta per la somministrazione (0,5 mg mL⁻¹) è stata definita sulla base di lavori precedenti, nei quali era emersa la capacità di tali derivati di migliorare la vitalità cellulare e di attenuare alterazioni indotte da xenobiotici. Nei mitili, gli idrolizzati proteici sono stati somministrati sia come unico trattamento, sia in co-esposizione con il contaminante di interesse (CMIT), secondo un disegno sperimentale in parallelo che ha incluso gruppi di controllo e gruppi miscelati (CMIT + BPHs). Questa impostazione ha

consentito di valutare la possibilità di un effetto protettivo indotto dall'alimento funzionale sia su parametri di vitalità cellulare (emociti, cellule della ghiandola digestiva) che su biomarcatori di stress ossidativo e difesa immunitaria. L'approccio adottato consente di interpretare gli idrolizzati non solo come fonte nutrizionale alternativa, ma come veri e propri modulatori fisiologici capaci di interagire con i meccanismi di adattamento allo stress invertebrato.

Le esposizioni con bergamotto e idrolizzati proteici hanno avuto una durata complessiva di 14 giorni, durante i quali le concentrazioni nei sistemi sperimentali sono state mantenute costanti mediante rinnovamento dell'acqua e reintegro delle sostanze a intervalli regolari (ogni due giorni). Ogni trattamento è stato condotto in triplicato, con gruppi di controllo processati in parallelo.

4.4 Saggi fisiologici, biochimici e molecolari

I seguenti protocolli rappresentano l'insieme completo delle metodiche analitiche utilizzate nei diversi studi sperimentali condotti. La selezione specifica dei saggi per ciascun esperimento è stata basata sugli obiettivi di ricerca e sulla natura dei contaminanti/trattamenti investigati, come dettagliato nelle rispettive sezioni dei risultati.

4.4.1. Vitalità cellulare

La stima della vitalità cellulare costituisce un passaggio essenziale nella caratterizzazione della citotossicità di xenobiotici, in quanto consente di quantificare in

modo rapido e attendibile la quota di cellule funzionalmente integre rispetto a quelle danneggiate (Stoddart, 2011). A tal fine sono stati impiegati due saggi colorimetrici complementari: il saggio di esclusione del Trypan Blue (TB) e quello della ritenzione del Neutral Red (NR), eseguiti su emociti e su cellule isolate della ghiandola digestiva (DG) prelevati dagli organismi modello considerati.

Il test del Trypan Blue si fonda sull'integrità selettiva della membrana plasmatica: cellule vitali con membrane integre escludono il colorante e appaiono otticamente trasparenti, mentre cellule necrotiche o gravemente danneggiate ne permettono l'ingresso assumendo una tonalità blu (Avelar-Freitas et al., 2014). Per evitare false-positività dovute a permeazione aspecifica del colorante, l'incubazione è stata limitata a 5 minuti (Strober, 2015). L'emolinfa è stata aspirata dal muscolo adduttore con siringhe sterili da 23 G (5 cm); le cellule della DG sono state ottenute secondo il protocollo di isolamento descritto nella sezione 4.4.3. I campioni sono stati miscelati 1:1 con soluzione di TB al 4 % (Sigma-Aldrich) e analizzati in camera di Bürker/Neubauer (Fisher Scientific) su almeno dieci campi casuali. La percentuale di vitalità è stata calcolata come indicato da Tresnakova et al. (2023):

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

Il saggio di ritenzione del Neutral Red valuta invece la stabilità delle membrane lisosomiali, considerate un sensibile indicatore precocissimo di danno sub-letale (Multisanti et al., 2024). Lisosomi funzionali sequestrano selettivamente il colorante cationico, che evidenzia i compartimenti acidi; un'eventuale lisi lisosomiale determina la diffusione del colorante nel citoplasma con conseguente perdita di intensità del segnale (Hu et al., 2015; Moore et al., 2009). Gli stessi pool cellulari utilizzati per il TB

sono stati incubati 10 minuti, rapporto 1:1, con soluzione di NR 0,8 % v/v diluita 1:1000 (Impellitteri et al., 2024). La quantificazione delle cellule NR-positive è stata eseguita nelle medesime camere emocitometriche, e il dato è stato espresso come percentuale di cellule con lisosomi intatti sul totale delle cellule conteggiate.

4.4.2. La fagocitosi

La fagocitosi rappresenta un meccanismo fondamentale dell'immunità innata negli invertebrati marini, mediante il quale gli emociti circolanti riconoscono, inglobano e degradano particelle estranee e patogeni (Multisanti et al., 2023). Il processo si articola in due fasi sequenziali: la fusione tra fagosomi e lisosomi con formazione dei fagolisosomi, seguita dall'attivazione di enzimi specifici per la degradazione del materiale fagocitato (Pagano et al., 2023). Le alterazioni nell'attività fagocitaria costituiscono pertanto un indicatore sensibile di compromissione immunitaria indotta da contaminanti ambientali. Il saggio è stato condotto su emociti prelevati da *M. galloprovincialis* e *P. imbricata* al termine dell'esposizione ai diversi contaminanti sperimentali. I campioni di emolinfa sono stati incubati per 30 minuti con sospensione di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*, concentrazione 1×10^7 cellule mL^{-1}) in provette Eppendorf da 1,5 mL. Tutti i campioni sono stati processati in triplicato. Al termine dell'incubazione, aliquote da 10 μL sono state depositate su vetrini pretrattati con poli-L-lisina A per favorire l'adesione cellulare, fissate in glutaraldeide all'1% e colorate con soluzione Giemsa al 5% per 5 minuti. I vetrini sono stati quindi sciacquati con acqua distillata e montati con Aquovitrex (Carlo Erba Reagents s.r.l.). L'attività fagocitaria è stata valutata mediante microscopia ottica a 400 \times , analizzando cinque campi casuali per vetrino secondo il protocollo di Carballal et al. (1997). Gli emociti fagocitanti sono stati identificati dalla presenza di lieviti

intracellulari colorati in blu dal Giemsa. Per garantire validità statistica, sono state contate almeno 100 cellule per sezione analizzata (Casellas et al., 1991). I risultati sono stati espressi come percentuale di fagocitosi secondo la formula:

$$\text{Fagocitosi (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ di emociti che hanno incorporato lieviti} / \text{n}^\circ \text{ totale di emociti}) \times 100$$

4.4.3. Saggio di Regolazione del Volume Cellulare (RVD)

La regolazione del volume cellulare rappresenta un processo omeostatico essenziale che consente alle cellule di mantenere un volume costante nonostante le variazioni osmotiche dell'ambiente extracellulare. In condizioni fisiologiche normali, le cellule sono in grado di attivare meccanismi compensatori di rigonfiamento (Regulatory Volume Decrease, RVD) o di contrazione (Regulatory Volume Increase, RVI) per ripristinare il volume originale dopo perturbazioni osmotiche transitorie (Hoffman et al., 2009). L'esposizione prolungata a sostanze citotossiche può compromettere questi delicati meccanismi adattativi, fornendo così informazioni preziose sul grado di danno fisiologico cellulare e sulla compromissione dell'integrità funzionale della membrana plasmatica. Il test RVD è stato condotto utilizzando cellule isolate della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* esposte ai diversi trattamenti sperimentali secondo tempi e concentrazioni variabili, seguendo il protocollo standardizzato di Torre et al. (2013) con le modifiche introdotte da Pagano et al. (2017) per ottimizzare la vitalità cellulare post-isolamento. Le ghiandole digestive sono state prelevate da quattro individui selezionati casualmente per ogni gruppo sperimentale e immediatamente sezionate meccanicamente in piccoli frammenti uniformi utilizzando lame sterili in soluzione isoosmotica priva di calcio e magnesio (CMFS: 220 mM HEPES, 600 mM NaCl, 12,5 mM

KCl) mantenuta a 4°C per preservare l'integrità cellulare. I frammenti tissutali sono stati quindi trasferiti in falcon sterili contenenti 0,01% di collagenasi (CLS IV, 175 U mg⁻¹, Sigma-Aldrich) e incubati in bagnetto termostatico per 1 ora a temperatura costante di 18°C sotto leggera agitazione per favorire la digestione enzimatica del tessuto connettivo. La sospensione cellulare ottenuta è stata successivamente filtrata sequenzialmente attraverso filtri sterili con porosità decrescente da 200 µm e 50 µm per rimuovere detriti cellulari e frammenti tissutali non digeriti, quindi risospesa delicatamente in soluzione fisiologica (1100 mOsm: NaCl 550 mM; KCl 12,5 mM; MgSO₄ 8 mM; CaCl₂ 4 mM; glucosio 10 mM; MgCl₂ 40 mM; HEPES 20 mM) e centrifugata a 400×g per 10 minuti a 4°C per concentrare le cellule. La procedura di risospensione e centrifugazione è stata ripetuta due volte consecutive per eliminare completamente i residui enzimatici e stabilizzare le cellule, seguita da un'ulteriore incubazione di 1 ora in bagnetto termostatico per permettere il recupero cellulare prima dell'analisi funzionale. Una goccia di circa 30 µL della sospensione cellulare finale è stata quindi depositata su vetrini precedentemente trattati con poli-L-lisina A allo 0,1% per favorire l'adesione cellulare e lasciata aderire per 5 minuti a temperatura ambiente in atmosfera umidificata per evitare l'essiccamento. I campioni sono stati osservati mediante microscopio ottico (Carl Zeiss Axioskop 20) equipaggiato con fotocamera digitale ad alta risoluzione (Canon EOS 550D) a ingrandimento 1000× con ottiche ad immersione per garantire la massima definizione delle strutture cellulari. Dopo un accurato lavaggio con soluzione isotonica per rimuovere cellule non aderenti e detriti, sono state acquisite tre immagini consecutive di riferimento (baseline) delle stesse cellule prima di procedere con l'applicazione del shock osmotico. Le cellule sono state quindi esposte a soluzione ipotonica (800 mOsm: NaCl 350 mM; KCl 12,5 mM; MgSO₄ 8 mM; CaCl₂ 4 mM; glucosio 10 mM; MgCl₂ 40 mM; HEPES 20 mM) applicata delicatamente per evitare danni

meccanici, innescando il processo di rigonfiamento cellulare osmotico. Il monitoraggio dinamico del volume cellulare è stato condotto per un periodo totale di 35 minuti con un protocollo di acquisizione differenziato: 10 immagini consecutive nei primi 10 minuti critici (IPO1-IPO10, una immagine ogni minuto) per catturare la fase acuta di rigonfiamento e l'eventuale attivazione dei meccanismi di compenso, seguite da 5 immagini acquisite a intervalli di 5 minuti ciascuna (IPO11-IPO15) per monitorare la fase di stabilizzazione e recupero del volume cellulare. Per garantire significatività statistica e riproducibilità dei risultati, l'analisi è stata condotta su un minimo di 15 cellule morfologicamente integre per ciascun gruppo sperimentale, con misurazione precisa dell'area cellulare effettuata mediante il software di analisi di immagine ImageJ (versione 1.54i, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) per il confronto quantitativo sistematico tra i gruppi di controllo e quelli trattati con i diversi xenobiotici testati.

4.4.4. Analisi istologiche e morfologiche

Le analisi istologiche sono state condotte su campioni tissutali fissati seguendo protocolli consolidati, volti a garantire l'integrità strutturale e la qualità morfologica dei tessuti. Per ciascun gruppo sperimentale, quattro esemplari di *M. galloprovincialis* sono stati eutanasiati mediante immersione in una soluzione di tricaina metansolfonato (MS-222, Syndel Laboratories Ltd., Qualicum Beach, BC, Canada) alla concentrazione di 1 g L⁻¹. Immediatamente dopo l'eutanasia, i tessuti sono stati immersi in soluzione di Bouin per la fissazione. Le branchie sono state quindi prelevate e processate per inclusione in paraffina: prima fissazione in Bouin, poi disidratazione in etanolo a concentrazione crescente, diafanizzazione in xilene e infine inclusione in paraffina. I blocchetti così

ottenuti sono stati sezionati con microtomo rotativo in fette di 7 μm di spessore. Per l'analisi morfologica, le sezioni tissutali sono state reidratate e colorate con due metodiche complementari. La prima, tricromica di Masson (Bio-optica Milano S.p.A., cat. # 04-010802), permette di distinguere:

- i nuclei (ematossilina ferrica di Weigert),
- gli eritrociti (acido picrico),
- il citoplasma (fucsina acida "ponceau de xyloidine"),
- il tessuto connettivo (blu anilina).

La seconda metodica, blu alciano pH 2,5 seguito da reazione PAS (Bio-optica S.p.A., cat. # 04-163802), è specifica per le mucine: il blu alciano lega le mucine acide formando un complesso insolubile ("blu monastrale"), non alterato dalla successiva reazione PAS, che colora invece mucine neutre e glicogeno. Entrambe le colorazioni sono state eseguite secondo le indicazioni del produttore. Al termine del periodo sperimentale, sono stati prelevati ulteriori campioni di branchie, ghiandola digestiva e gonadi maschili e femminili. Tali tessuti sono stati fissati in formaldeide tamponata al 10 % (PBS) a temperatura ambiente per 24h, quindi processati con protocollo analogo (disidratazione in serie di etanolo, diafanizzazione, paraffina) e sezionati a 5 μm . Le sezioni sono state deparaffinate in xilene e alcol e successivamente colorate con ematossilina-eosina (H&E) e tricromica di Masson, per una valutazione complessiva della morfologia e delle eventuali alterazioni patologiche. Tutte le sezioni sono state esaminate in cieco rispetto ai gruppi di trattamento da un istopatologo esperto, utilizzando microscopi ottici Leica (modelli DM6 o DMRB, Milano, Italia) dotati del sistema di imaging LasX Navigator (Leica Microsystems, Milano, Italia) (Petrosino et al., 2017; D'Amico et al., 2021). Per la

valutazione semiquantitativa della risposta infiammatoria, si è adottata una scala arbitraria a quattro livelli (Bouallegui et al., 2017):

0 = assenza o minima infiltrazione emocitaria

1 = infiltrazione bassa

2 = infiltrazione moderata

3 = massima infiltrazione o presenza di aggregati emocitari

4.4.5. Parametri biochimici ed elettrolitici

L'analisi di questi parametri risponde all'esigenza di monitorare il bilancio ionico degli animali e identificare eventuali alterazioni fisiopatologiche indotte da contaminanti o trattamenti, fornendo una misura indiretta sia dello stato generale di salute sia del potenziale danno cellulare. Per ogni gruppo sperimentale, sono stati prelevati campioni di emolinfa tramite siringa sterile e campioni di acqua di allevamento per l'analisi comparativa degli elettroliti. Le concentrazioni di Na^+ , K^+ , Cl^- , P , Mg^{2+} e Ca^{2+} sono state quantificate mediante analizzatore multi-parametrico KONELAB 60 THERMO (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), calibrato secondo le procedure fornite dal produttore. Tali dosaggi hanno permesso di valutare eventuali squilibri ionici dovuti all'esposizione sperimentale. Come marcatore di danno cellulare, l'attività della lattato deidrogenasi (LDH) è stata misurata nell'emolinfa utilizzando un kit enzimatico colorimetrico commerciale, seguendo le istruzioni del fornitore.

4.4.6. Biomarker di stress ossidativo

La valutazione dei biomarker di stress ossidativo è stata condotta seguendo il protocollo generale di Filice et al. (2023), con i dettagli analitici riportati nei supplementi di Martyniuk et al. (2022). I campioni di tessuto della ghiandola digestiva sono stati preparati individualmente da sei molluschi per ciascun saggio sperimentale in aliquote monouso. Branchie e ghiandola digestiva (n = 6–8 per condizione) sono state omogeneizzate a 4 °C in tampone fosfato 0,1 M pH 7,4 contenente 100 mM KCl, 1 mM EDTA e 0,1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) per l'inibizione della proteolisi, preparando omogenati al 10% (p/v). Gli omogenati sono stati centrifugati a 6000×g per 10 min e i sovranatanti conservati a -40 °C per le successive analisi. La concentrazione proteica nel sovranatante (proteine solubili) è stata misurata secondo il metodo di Lowry et al. (1951), utilizzando albumina sierica bovina (BSA) come standard proteico. I valori di assorbanza sono stati misurati mediante spettrofotometro UV/Vis ULAB 102UV. Tutti i saggi sono stati eseguiti in triplice replicato tecnico e i risultati normalizzati sul contenuto proteico. Per ciascun omogenato sono stati quindi eseguiti i saggi seguenti:

- Perossidazione lipidica (LPO): misurata come sostanze reattive all'acido 2-tiobarbiturico (TBARS) secondo Ohkawa et al. (1979) con adattamenti. Si è incubata una miscela composta da omogenato al 10% (p/v), quindi le proteine sono state precipitate con acido sulfosalicilico prima dell'incubazione con TBA. Il sovranatante è stato analizzato a 532 nm per quantificare la malondialdeide (MDA) utilizzando un coefficiente di estinzione di $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. I risultati sono espressi come $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco (PF).

- Ossidazione delle proteine (OMP): determinata mediante derivatizzazione con 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) secondo Levine et al. (1990), modificato da Reznick e Packer (1994). I carbonili proteici (PC) sono stati determinati nei sedimenti proteici precipitati con acido sulfosalicilico. Il contenuto di gruppi carbonilici è stato misurato a 370 nm, utilizzando un coefficiente di estinzione di $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ed espresso come $\mu\text{mol PC}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PF}$.
- Attività della superossido dismutasi (SOD, EC 1.15.1.1): valutata mediante il saggio non enzimatico basato sulla riduzione aerobica del nitro-blu tetrazolio (NBT) in presenza di fenazinametosolfato e NADH secondo Fried (1975). Per valutare l'attività Mn-SOD, il sovrinatante è stato preincubato per 60 min a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ in presenza di 5 mM KCN, che produce inibizione totale della Cu,Zn-SOD. L'attività di quest'ultima è stata calcolata come differenza tra le attività in assenza e presenza di KCN. La riduzione di NBT è stata registrata a 560 nm. I risultati sono espressi come unità SOD per mg di proteina solubile (un'unità di SOD è definita come la quantità di enzima che causa il 50% di inibizione della riduzione di NBT).
- Attività della catalasi (CAT, EC 1.11.1.6): misurata monitorando la decomposizione di H_2O_2 secondo Aebi (1974). La reazione è stata misurata a 240 nm ($\epsilon = 0,04 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) ed espressa come $\mu\text{mol min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ di proteina solubile.
- Attività della glutatione S-transferasi (GST, EC 2.5.1.18): saggiata spettrofotometricamente a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizzando glutatione ridotto (GSH) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) come substrato in tampone Tris-HCl 100 mM, pH 7,4 secondo Habig et al. (1974). L'aumento dell'assorbanza a 340 nm è stato registrato per 2 min. L'attività GST è stata calcolata utilizzando $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ed espressa come $\text{nmol min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ di proteina solubile.

- Concentrazione totale di glutatione (GSH + GSSG): quantificata sull'estratto privo di proteine dell'omogenato al 10% (p/v) mediante il saggio di riciclaggio della glutatione reduttasi secondo Griffith (1980), utilizzando DTNB (5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)) per la determinazione dei tioli liberi ed espressa come nmol g⁻¹ PF. La concentrazione di GSH è stata calcolata come differenza tra le concentrazioni totali di glutatione e GSSG. È stato calcolato l'indice redox del glutatione (RI GSH) come rapporto delle concentrazioni GSH/GSSG.

4.4.7. Attività apoptotiche

L'apoptosi è stata valutata misurando due attività enzimatiche chiave: la caspasi-3-like e la catepsina D, considerate indicatori rispettivamente delle fasi esecutive dell'apoptosi e del rilascio lisosomiale di enzimi protolitici. Per ciascun campione, il tessuto d'interesse è stato omogeneizzato al 25% (p/v) in tampone di lisi freddo contenente 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 4% Triton X-100, 150 mM NaCl, 8 mM EDTA, 20 mM ditiotreitolo e 350 µg mL⁻¹ di PMSF. Dopo 10 min su ghiaccio, l'omogenato è stato centrifugato a 12.000×g per 10 min a 4 °C e il sovratanante raccolto per le analisi. Per la caspasi-3-like, si è utilizzato il substrato sintetico Ac-DEVD-pNA: 50 µL di estratto proteico sono stati incubati con 200 µM di Ac-DEVD-pNA a 25 °C. Il rilascio di p-nitroanilina (pNA) è stato misurato spettrofotometricamente a 405 nm ogni 10 min per 2 h ($\epsilon = 10,5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e l'attività è espressa come pmol pNA min⁻¹ mg⁻¹ di proteine solubili (Kaushal et al., 2014). L'attività della catepsina D (CtD, EC 3.4.23.5) è stata determinata usando emoglobina denaturata in ambiente acido come substrato (Barrett, 1977). Per valutare la CdD "libera" (CtDe), l'omogenato è stato trattato senza detergente; per l'attività totale (CtDt), è stato aggiunto Triton X-100 al 1%. Dopo incubazione a 37 °C per 1 h, la digestione è stata interrotta con

TCA e il prodotto solubile è stato misurato a 280 nm. La differenza CtDt–CtDe rappresenta l'enzima rilasciato dai lisosomi.

4.4.8. Analisi del bisso

La produzione e la quantità dei filamenti e delle placche bissali rappresentano un indice funzionale della capacità di ancoraggio, della distribuzione energetica e dello stato fisiologico dei mitili. Queste strutture proteiche, essenziali per l'adesione al substrato, riflettono l'equilibrio tra l'allocazione di risorse per il mantenimento e la risposta a eventuali fattori di stress ambientale.

Al termine del periodo di acclimatazione, per ciascun gruppo sperimentale due mitili sono stati scelti casualmente e il bisso è stato reciso il più vicino possibile al margine del mantello con forbici chirurgiche sterili, preservando l'integrità dei tessuti sottostanti. Gli esemplari sono quindi stati alloggiati singolarmente in becher da 1 L (due per vasca sperimentale), mantenuti sotto aerazione continua e con rinnovo dell'acqua secondo le stesse modalità previste per i sistemi di mantenimento principali. Dopo 14 giorni, i filamenti bissali rigenerati sono stati nuovamente recisi nello stesso punto di attacco e raccolti per la valutazione morfometrica. Per ogni individuo sono stati determinati il numero di placche bissali e la lunghezza di ciascuna. Le misurazioni sono state effettuate su immagini acquisite con uno stereomicroscopio equipaggiato con fotocamera AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss MicroImaging, Wetzlar, Germania) e analizzate mediante il software AxioVision AC Rel. 4.5.

4.5 Analisi statistiche

I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD) o, quando indicato, come media \pm errore standard (SE). L'elaborazione e le analisi statistiche sono state eseguite con i software GraphPad Prism (v. 5, 6, 8.2.1 e 10.0), IBM SPSS Statistics 24 e SigmaPlot. Per ciascuna variabile è stata preliminarmente verificata la normalità della distribuzione mediante il test di Shapiro–Wilk (o, in alternativa, Kolmogorov–Smirnov) e l'omogeneità delle varianze mediante il test di Levene. In presenza di violazioni di tali presupposti, sono stati adottati test non parametrici: Kruskal–Wallis ANOVA per valutare l'effetto complessivo del fattore sperimentale, seguito dal test di Mann–Whitney U per confronti a coppie. Negli esperimenti in cui i dati soddisfacevano i requisiti di normalità e omogeneità, l'effetto dei trattamenti è stato valutato mediante ANOVA a una via. Qualora l'ANOVA indicasse un effetto globale significativo ($p < 0,05$), si è proceduto con il test post-hoc di Tukey's HSD o, in alternativa, con il Student–Newman–Keuls, per identificare le differenze tra i gruppi. Nei casi in cui fosse necessario analizzare simultaneamente due fattori (per es. trattamento e tempo), è stata impiegata un'ANOVA a due vie, seguita da un test di Bonferroni per le comparazioni multiple. Per indagare le relazioni multidimensionali fra i parametri misurati, i dataset che risultavano normalmente distribuiti e con varianze omogenee sono stati sottoposti a Principal Component Analysis (PCA) con rotazione Varimax e Kaiser Normalization. I punteggi ottenuti sono stati successivamente utilizzati in un'analisi discriminante canonica, al fine di valutare la capacità dei biomarker di discriminare i diversi gruppi sperimentali.

In tutte le elaborazioni il livello di significatività è stato fissato a $p < 0,05$. Le figure e i grafici sono stati generati con GraphPad Prism, al fine di uniformare la presentazione dei risultati.

5. RISULTATI

5.1 Esposizione al BIT

I dettagli metodologici e i risultati completi di questo studio sono consultabili in: Impellitteri et al., 2025a, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 290, 117631. Di seguito è riportata la prima pagina dell'articolo.

Ecotoxicology and Environmental Safety 290 (2025) 117631



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Ecotoxicology and Environmental Safety

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



Evaluation of cellular and physiological alterations of cells from *Mytilus galloprovincialis* exposed to benzisothiazolinone

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

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

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

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



In questo studio, cellule di emociti e ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* sono state esposte acutamente (1 e 3 ore) a due concentrazioni ambientalmente rilevanti di BIT: B1 (0,03 µg/L) e B2 (0,3 µg/L). L'obiettivo è stato quello di valutare gli effetti citotossici e le risposte molecolari precoci attraverso l'analisi di parametri cellulari (vitalità, attività fagocitaria, regolazione del volume) e dell'espressione genica di marcatori di stress ossidativo.

La vitalità degli emociti e delle cellule della ghiandola digestiva è stata valutata in seguito all'esposizione a due concentrazioni di BIT (B1: 0,03 µg/L; B2: 0,3 µg/L) per 1 e 3 ore, rispettivamente, utilizzando il metodo di esclusione del TB e il saggio di ritenzione del NR.

I risultati presentati nella Tabella 1 dimostrano che, nel caso degli emociti, si osserva una riduzione della vitalità nei gruppi esposti alle due concentrazioni di BIT rispetto al controllo (TB 1 h e 3 h pari al 98,50% ± 1,38 rispettivamente). Nelle cellule esposte a B1, analizzate mediante TB, si è registrata una riduzione al 97,83% ± 1,47 dopo 1 h, così come a 3 h (97,00% ± 1,79). Al contrario, le cellule esposte a B2 hanno mostrato un leggero aumento della vitalità cellulare del 98,50% ± 1,76 dopo 1 h, ma una riduzione significativa del 96,00% ± 1,67 dopo 3 h ($p < 0,05$). Un pattern comparabile è emerso quando le cellule sono state colorate con NR. Rispetto al controllo, le cellule colorate con NR hanno esibito un profilo di vitalità simile, con il 98,00% ± 1,10 di vitalità osservato sia a 1 h che a 3 h. Tuttavia, si osserva una leggera diminuzione con la concentrazione più bassa (97,33% ± 1,51 e 97,33% ± 2,34 di vitalità dopo 1 h e 3 h rispettivamente). Al contrario, le cellule esposte alla concentrazione più elevata (B2) dimostrano un declino pronunciato, con una vitalità del 94,33% ± 1,47 osservata a 3 h ($p < 0,05$).

Tabella 1: Percentuale di vitalità degli emociti e delle cellule della ghiandola digestiva in *M. galloprovincialis* dopo diversi tempi di esposizione (1 h; 3 h) al BIT a due diverse concentrazioni (B1: 0,03 µg/L; B2: 0,3 µg/L). I test condotti sono stati il metodo di esclusione del Trypan Blue (TB) e il saggio di ritenzione del Rosso Neutro (NR).

Tipo cellulare	Metodo	Tempo	CTR (0 mg/L)	B1 (0,03 µg/L)	B2 (0,3 µg/L)
Emociti	TB	1 h	98,50 ± 1,38	97,83 ± 1,47	98,50 ± 1,76
	TB	3 h	98,50 ± 1,38	97,00 ± 1,79	96,00 ± 1,67*
	NR	1 h	98,00 ± 1,10	97,33 ± 1,51	98,00 ± 1,10

Ghiandola digestiva	NR	3 h	98,00 ± 1,10	97,33 ± 2,34	94,33 ± 1,47*
	TB	1 h	99,17 ± 0,75	99,00 ± 0,01	98,67 ± 0,52
	TB	3 h	99,17 ± 0,31	97,83 ± 0,17**	99,33 ± 0,21
	NR	1 h	98,67 ± 0,52	98,50 ± 0,55	99,67 ± 0,52*
	NR	3 h	98,67 ± 0,52	97,50 ± 1,05*	99,33 ± 0,53

**I valori sono espressi come percentuale ± deviazione standard (n = 6). L'ANOVA a una via è stata utilizzata per valutare le differenze tra il gruppo controllo (CTR) e i gruppi sperimentali. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo: *p < 0,05; **p < 0,01.*

Inoltre, i risultati sulla vitalità delle cellule DG trattate con TB (Tabella 1) non hanno mostrato cambiamenti significativi dopo 1 ora, mentre dopo 3 ore si è osservata una differenza significativa ($p < 0,01$) tra CTR e B1 e anche tra le due concentrazioni. Nel caso della colorazione con NR, differenze significative ($p < 0,05$) sono state già osservate dopo 1h, specificamente tra CTR e B2 e tra i due trattamenti ($p < 0,01$); dopo 3 h si è osservato una tendenza simile con una differenza significativa ($p < 0,05$) tra CTR e in questo caso B1, ma anche tra le due concentrazioni trattate ($p < 0,01$).

L'attività fagocitaria degli emociti esposti a diverse concentrazioni di BIT (B1: 0,03 µg/L; B2: 0,3 µg/L) a diversi tempi sperimentali di esposizione (T1: 1 h; T2: 3 h) ha dimostrato alterazioni dipendenti dalla concentrazione e dal tempo. La Figura 21(a) mostra i risultati per la capacità fagocitaria degli emociti esposti a B1 e B2 al tempo di esposizione più breve (T1). In particolare, sono state osservate differenze significative (** $p < 0,01$) tra entrambi i gruppi sperimentali (B1 e B2) rispetto al gruppo di controllo. Un'ulteriore differenza significativa ($p < 0,01$), espressa nella Figura 21(a;b) dai diversi numeri sopra le colonne, è stata osservata tra i gruppi sperimentali esposti alle due diverse concentrazioni di BIT, ovvero B1 rispetto a B2.

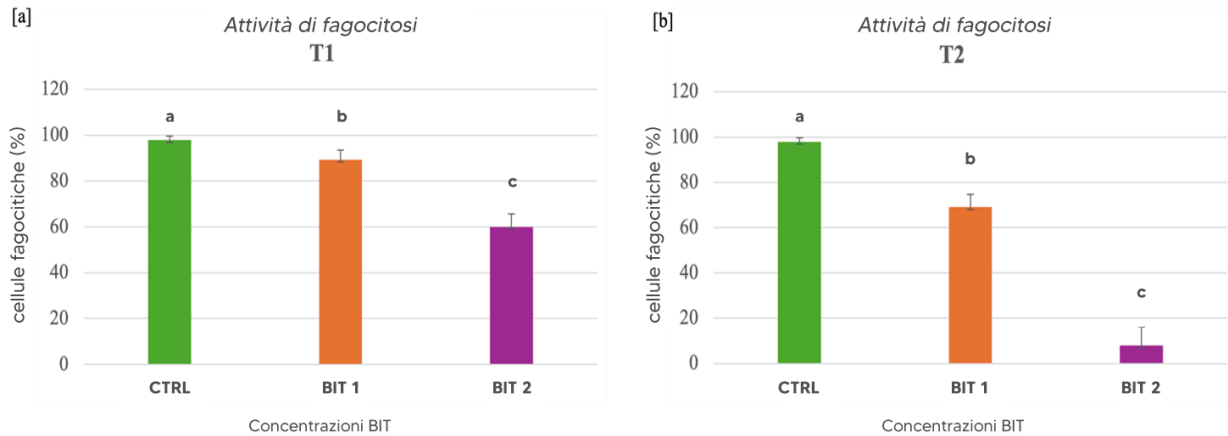


Figura 21: Effetti sull'attività fagocitaria degli emociti dopo esposizione al BIT (B1: 0,03 $\mu\text{g/L}$ di BIT; B2: 0,3 $\mu\text{g/L}$ di BIT) a T1 (1 h) e T2 (3 h). L'attività fagocitaria è stata espressa in termini di percentuale media \pm DS. L'ANOVA a una via è stata utilizzata per stabilire la differenza tra il CTR e i gruppi sperimentali e per confrontare i gruppi B1 e B2 tra loro. I valori sono presentati come media \pm DS ($n = 6$). Gli asterischi rappresentano le differenze rispetto al gruppo di controllo ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$).

I risultati dimostrano una riduzione della capacità fagocitaria con l'aumentare della concentrazione di BIT. In particolare, sono state osservate differenze significative ($**p < 0,01$) tra i due gruppi sperimentali esposti al BIT (B1 e B2) rispetto al gruppo di controllo. Inoltre, è stata osservata una differenza significativa ($p < 0,01$) tra i due gruppi sperimentali esposti a B1 e B2.

In condizioni fisiologiche, le cellule delle ghiandole digestive di *M. galloprovincialis* hanno dimostrato la caratteristica capacità di modulare il loro volume aumentando o diminuendo l'area cellulare quando esposte a soluzioni con un'osmolarità che differisce da quella fisiologica (freccia nelle Figura 22 e Figura 23). Per esempio, quando esposte a una soluzione ipotonica, le cellule potrebbero tornare alla loro forma originale dopo un iniziale, graduale ingrandimento. Come illustrato nella Figura 22, in seguito a un'esposizione di 1 ora al BIT, le cellule hanno esibito un trend divergente

rispetto al controllo. Infatti, quelle esposte alla concentrazione più bassa (B1) hanno mostrato un maggiore aumento dell'area cellulare, mentre alla concentrazione più elevata (B2) le cellule non sono state in grado di aumentare la loro area in risposta alla soluzione ipotonica e sono andate incontro a restringimento dopo l'analisi, fallendo nel tornare alla loro forma originale. Un pattern comparabile emerge in seguito a un'esposizione di tre ore al composto (Figura 23). In questo caso, le cellule esposte a B1 sono rimaste gonfie, dimostrando un'incapacità di tornare alla loro struttura originale. Similarmente alle osservazioni fatte alla prima ora, le cellule esposte a B2 hanno esibito un pattern di rigonfiamento naturale, piuttosto che andare incontro a restringimento. Un'analisi statistica ha rivelato una differenza significativa nelle cellule esposte al BIT dopo una e tre ore. C'era una distinzione notevole tra il controllo e le cellule esposte a B2, così come tra le cellule esposte alle due concentrazioni ($p < 0,01$).

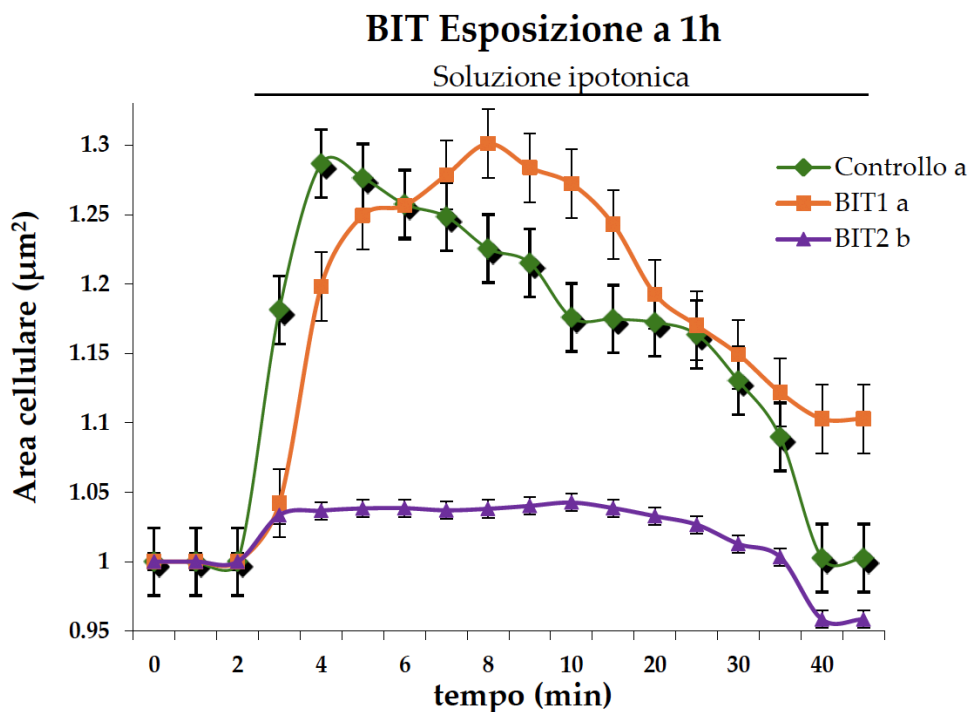


Figura 22: Variazioni del volume cellulare in cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* in seguito all'esposizione a benzisothiazolinone per 1 ora. Le curve rappresentano le modificazioni del volume cellulare nel tempo (min) in risposta alla soluzione ipotonica. I simboli indicano: rombi (◆) gruppo controllo (0 µg/L); quadrati (■) gruppo B1 (0,03 µg/L di BIT); triangoli (▲) gruppo B2 (0,3 µg/L di BIT). La linea verticale denota la transizione dalla soluzione isotonica (tre immagini di riferimento catturate come controllo) alla soluzione ipotonica, che ha determinato una variazione del volume cellulare. I dati sono espressi come area cellulare media \pm deviazione standard di misurazioni effettuate su almeno 15 cellule per gruppo. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA a una via seguita dal test post-hoc di Tukey. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

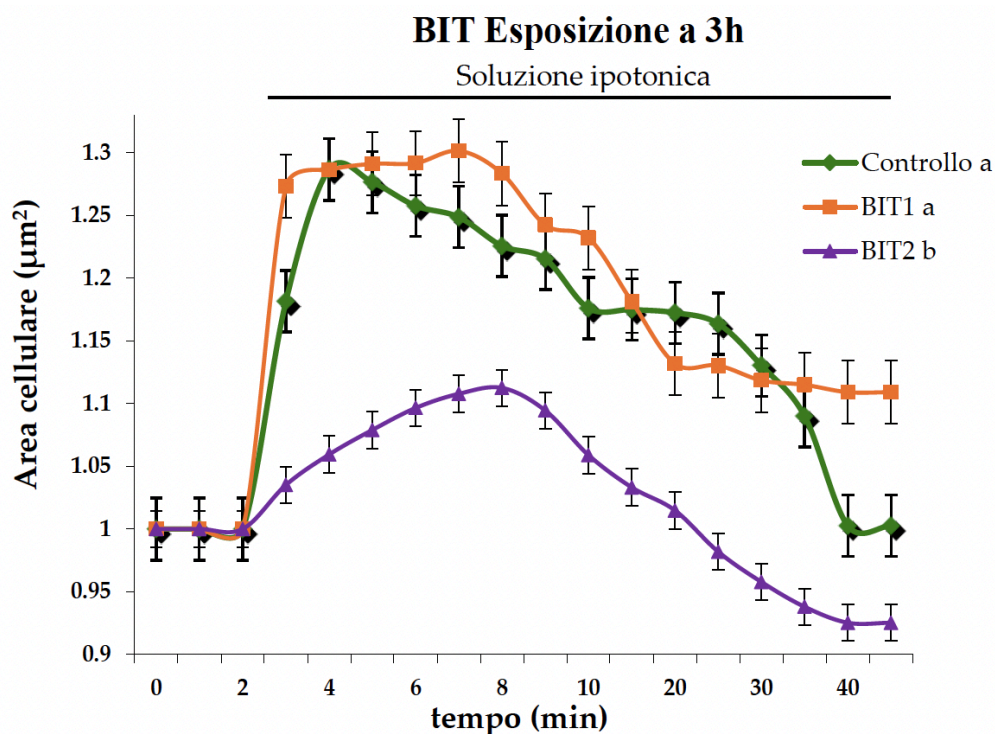


Figura 23: Modulazione del volume cellulare in cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* in seguito a esposizione prolungata (3 ore) al BIT. Le curve mostrano l'andamento temporale (min) delle variazioni volumetriche cellulari in risposta al challenge ipotonico. La simbologia utilizzata è la seguente: rombi (◆) rappresentano il gruppo controllo (0 µg/L); quadrati (■) identificano il gruppo B1 (0,03 µg/L di BIT); triangoli (▲) indicano il gruppo B2 (0,3 µg/L di BIT). La linea verticale segna il passaggio dalla condizione isotonica iniziale (documentata attraverso tre acquisizioni di riferimento) alla fase ipotonica, responsabile delle alterazioni del volume cellulare osservate. I valori sono riportati come area cellulare media \pm deviazione standard, calcolati su un minimo di 15 cellule per ciascun gruppo sperimentale. L'elaborazione statistica è stata eseguita tramite ANOVA a una via con successivo test post-hoc di Tukey. Lettere differenti denotano significatività statistica ($p < 0,05$).

5.2. Esposizione all'OIT

I dettagli metodologici e i risultati completi di questo studio sono consultabili in: Multisanti et al., 2025b, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 302, 118563. Di seguito è riportata la prima pagina dell'articolo.



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

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



Discovering the effects of octylisothiazolinone: analysis of physiological changes in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*)

Cristiana Roberta Multisanti^a, Federica Impellitteri^a, Giorgia Cannatà^b, Annalisa Cotugno^b,
Monia Perugini^c, Giuseppe Piccione^a, Caterina Faggio^{b,d,*}, Maria Giovanna Rizzo^b

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

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

^c Department of Feed and Food Sciences, Teramo University, Viale Crispi 212, Teramo 64100, Italy

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

In questo studio, esemplari di *M. galloprovincialis* sono stati esposti cronicamente (14 giorni) a due concentrazioni di OIT: E1 (0,01 mg L⁻¹) ed E2 (0,1 mg L⁻¹), per valutare gli effetti su diversi parametri cellulari e fisiologici. L'esposizione cronica all'OIT ha determinato alterazioni significative della vitalità degli emociti, con effetti dose-dipendenti particolarmente evidenti alla concentrazione più bassa. Il saggio di ritenzione del NR, utilizzato per valutare la stabilità delle membrane lisosomiali, ha evidenziato una significativa compromissione nel gruppo E1 (0,01 mg L⁻¹) rispetto al controllo ($p < 0,01$) (Figura 24). È degno di nota che il gruppo E2 (0,1 mg L⁻¹) abbia mostrato una riduzione significativamente meno marcata rispetto al controllo ($p < 0,05$), indicando una potenziale risposta adattativa a concentrazioni più elevate.

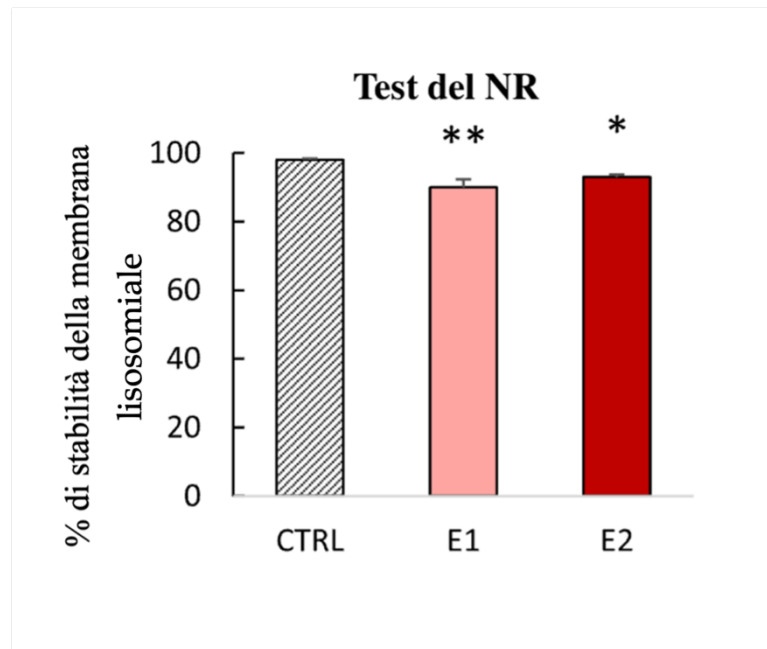


Figura 24: Test di ritenzione del rosso neutro negli emociti. I dati sono stati ottenuti dopo l'esposizione di *M. galloprovincialis* a due concentrazioni di OIT (E1: 0,01 mg L⁻¹ ed E2: 0,1 mg L⁻¹) per 14 giorni. I valori sono espressi come media \pm S.E. * indica differenze significative tra E1 ed E2 rispetto al controllo ($p < 0,05$); ** indica differenze significative tra E1 ed E2 rispetto al controllo ($p < 0,01$).

Il test di esclusione del TB, che valuta l'integrità della membrana cellulare, ha evidenziato una diminuzione degli emociti vitali in entrambi i gruppi esposti, con una riduzione più pronunciata in E1 e una riduzione significativa ma minore in E2 rispetto al controllo ($p < 0,05$) (Figura 25).

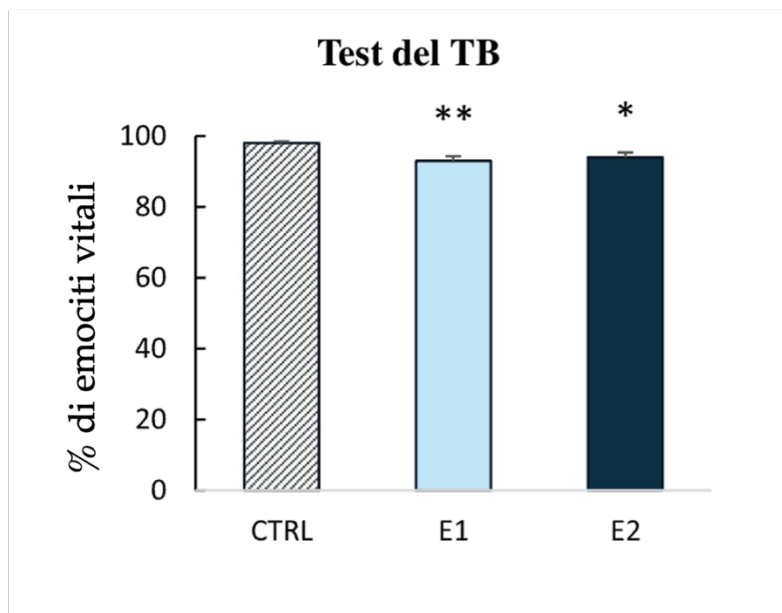


Figura 25: Test di esclusione del TB negli emociti. I dati sono stati ottenuti dopo l'esposizione di *M. galloprovincialis* a due concentrazioni di OIT (E1: 0,01 mg L⁻¹ ed E2: 0,1 mg L⁻¹) per 14 giorni. I valori sono espressi come media \pm S.E. * indica differenze significative tra E1 ed E2 rispetto al controllo ($p < 0,05$); ** indica differenze significative tra E1 ed E2 rispetto al controllo ($p < 0,01$).

L'attività fagocitaria degli emociti ha subito una drammatica compromissione in seguito all'esposizione all'OIT. Mentre il gruppo controllo manteneva un'elevata capacità fagocitaria ($98,2 \pm 0,43\%$), entrambi i gruppi esposti hanno mostrato una drastica riduzione di questa funzione immunitaria fondamentale (Figura 26). Il gruppo E1 ha registrato una capacità fagocitaria del $44,00 \pm 5,58\%$, mentre E2 ha mostrato valori del $46,00 \pm 3,9\%$, entrambi significativamente inferiori al controllo ($p < 0,01$). Questi risultati indicano una severa compromissione del sistema immunitario innato, indipendentemente dalla concentrazione di esposizione.

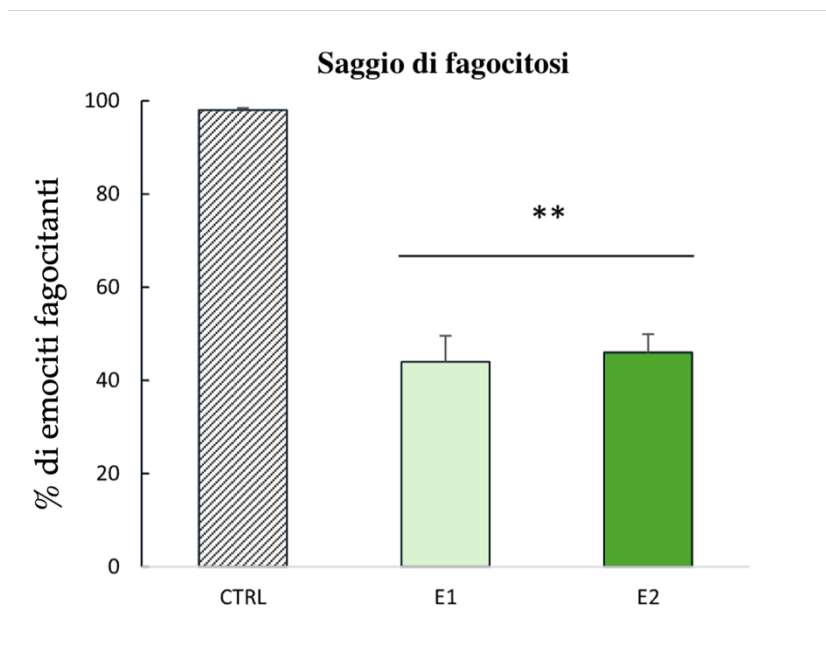


Figura 26: Capacità fagocitaria degli emociti di *M. galloprovincialis* dopo due settimane di esposizione a due concentrazioni di OIT (E1: 0,01 mg L⁻¹ ed E2: 0,1 mg L⁻¹). L'attività fagocitaria è espressa come percentuale media di cellule fagocitanti ± S.E. * indica differenze significative tra E1 ed E2 rispetto al controllo ($p < 0,05$); ** indica differenze significative tra E1 ed E2 rispetto al controllo ($p < 0,01$).

Le cellule della ghiandola digestiva hanno mostrato una sensibilità differente all'esposizione all'OIT rispetto agli emociti. Il saggio di ritenzione del NR ha evidenziato una significativa riduzione della stabilità lisosomiale solo nel gruppo E1 rispetto al controllo ($p < 0,05$), mentre il gruppo E2 non ha mostrato alterazioni significative. Il test di esclusione del TB ha mostrato risultati coerenti, con una diminuzione della vitalità cellulare solo nel gruppo E1 rispetto al controllo ($p < 0,05$), mentre nessuna differenza significativa è stata osservata tra E2 e il controllo (Figura 27).

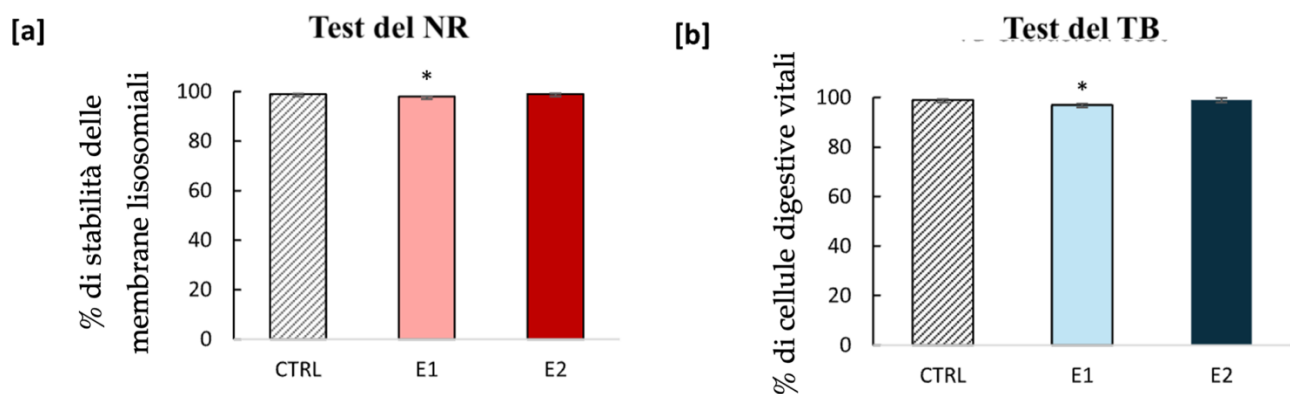


Figura 27: [a] Saggio di ritenzione del NR; [b] Test di esclusione del TB nelle cellule isolate della ghiandola digestiva. Tutti i dati sono stati ottenuti dopo esposizione di esemplari di *M. galloprovincialis* a due concentrazioni di OIT (E1: 0,01 mg L⁻¹ ed E2: 0,1 mg L⁻¹) per 14 giorni. I dati sono espressi come medie \pm errore standard.** indica differenze significative tra E1 ed E2 rispetto al controllo ($p < 0,01$).

La capacità di regolazione del volume cellulare (RVD), un parametro cruciale per valutare la funzionalità osmotica delle cellule, non ha mostrato alterazioni sostanziali in nessuno dei gruppi trattati rispetto al controllo (Figura 28). Questo suggerisce che, nonostante gli effetti sulla vitalità cellulare, i meccanismi di regolazione osmotica rimangono funzionalmente intatti dopo l'esposizione cronica all'OIT.

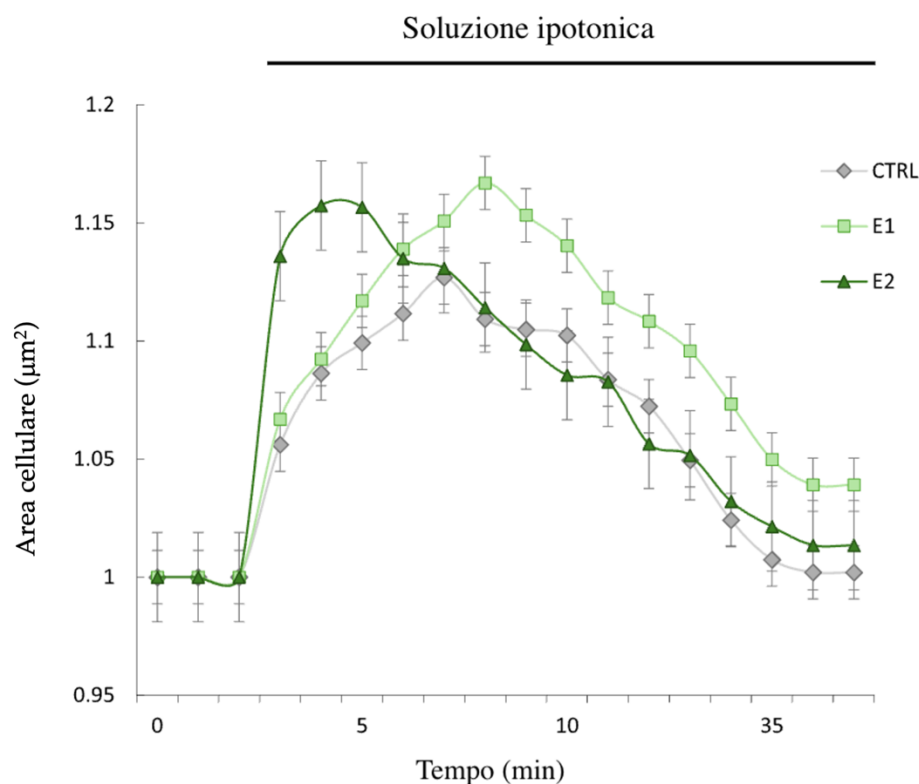


Figura 28: Regolazione della diminuzione del volume (RVD) delle cellule della ghiandola digestiva dopo esposizione di due settimane a due concentrazioni di OIT (E1: 0,01 mg L⁻¹ ed E2: 0,1 mg L⁻¹). In soluzione ipotonica, le cellule tendono a gonfiarsi. La linea nera sopra le curve sottolinea l'inizio degli effetti ipotonici. I rombi (◆) rappresentano il gruppo controllo (0 mg L⁻¹); i quadrati (■) rappresentano E1 (0,01 mg L⁻¹); i triangoli (▲) rappresentano E2 (0,1 mg L⁻¹). I valori sono espressi come media ± errore standard delle cellule selezionate (n = 15).

5.3. Esposizione al Quaternium-15

5.3.1. *Mytilus galloprovincialis*

I dettagli metodologici e i risultati completi di questo studio sono consultabili nell'articolo: Impellitteri et al., 2024a, *Science of the Total Environment*, 918, 170568. Di seguito è riportata la prima pagina dell'articolo.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Science of the Total Environment

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

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



Nel presente studio, esemplari di *M. galloprovincialis* sono stati esposti cronicamente a due concentrazioni di Quaternium-15 (E1: 0,5 mg/L; E2: 1 mg/L) per periodi di 7 e 14 giorni, al fine di valutare le alterazioni cellulari e fisiologiche indotte da questo conservante.

L'analisi della vitalità delle cellule della ghiandola digestiva ha rivelato un pattern di tossicità tempo e dose-dipendente. Dopo una settimana di esposizione, gli effetti citotossici sono risultati limitati e concentrazione-specifici (Tabella 2). Il saggio NR ha evidenziato una compromissione significativa della stabilità lisosomiale esclusivamente nel gruppo esposto alla concentrazione maggiore (E2), con una riduzione della vitalità al $96,5 \pm 0,6\%$ rispetto al controllo ($98,5 \pm 0,6\%$) ($p < 0,05$). Interessante notare come il gruppo E1 abbia mantenuto valori di vitalità sostanzialmente sovrapponibili a quelli del controllo ($98,5 \pm 0,5\%$), suggerendo una soglia di tossicità compresa tra le due concentrazioni testate.

Tabella 2: Valutazione della vitalità cellulare in cellule di ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* esposte a Quaternium-15 per 7 e 14 giorni. I saggi di vitalità sono stati condotti mediante test di esclusione del Trypan Blue (TB) e saggio di ritenzione del Rosso Neutro (NR).

Saggio	Tempo	Controllo	E1 (0,5 mg/L)	E2 (1 mg/L)
TB	7 giorni	98,6 ± 0,4	98,5 ± 0,5	98,1 ± 0,5
NR	7 giorni	98,5 ± 0,6 ^a	98,5 ± 0,5 ^a	96,5 ± 0,6 ^b
TB	14 giorni	99,2 ± 0,3 ^a	95,3 ± 1,5 ^b	96,9 ± 0,7 ^a
NR	14 giorni	99,1 ± 0,3 ^a	97,6 ± 0,5 ^a	97,2 ± 0,7 ^b

I valori rappresentano la percentuale media di vitalità ± errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$, ANOVA one-way seguita da test post-hoc di Tukey). I valori significativamente diversi dal controllo sono evidenziati in grassetto.

L'estensione dell'esposizione a quattordici giorni ha determinato un'intensificazione degli effetti citotossici, con il coinvolgimento anche della concentrazione più bassa. Il test TB ha rivelato una marcata riduzione della vitalità cellulare nel gruppo E1, che ha registrato valori del $95,3 \pm 1,5\%$ contro il $99,2 \pm 0,3\%$ del controllo ($p < 0,01$). Parallelamente, il saggio NR ha confermato la persistente tossicità della concentrazione maggiore, con il gruppo E2 che ha mostrato una vitalità del $97,2 \pm 0,7\%$ rispetto al controllo ($99,1 \pm 0,3\%$) ($p < 0,05$). Diversamente dal pattern osservato a 7 giorni, non sono emerse differenze significative tra i due trattamenti, indicando una convergenza degli effetti tossici nel tempo.

L'analisi della capacità di regolazione del volume cellulare ha evidenziato alterazioni precoci e progressive della funzionalità osmotica. Dopo sette giorni di esposizione, le cellule del controllo e del gruppo E1 hanno mantenuto una risposta fisiologica comparabile alla sfida ipotonica, raggiungendo rispettivamente un rigonfiamento massimo del 16,5% e 13,0% e recuperando successivamente il volume originale. Al contrario, le cellule esposte alla concentrazione E2 hanno mostrato una risposta osmotica

compromessa, caratterizzata da un rigonfiamento ridotto (9,6%) e dall'incapacità di ripristinare il volume iniziale, con una tendenza al raggrinzimento che ha determinato differenze significative rispetto al controllo ($p < 0,01$) (Figura 29).

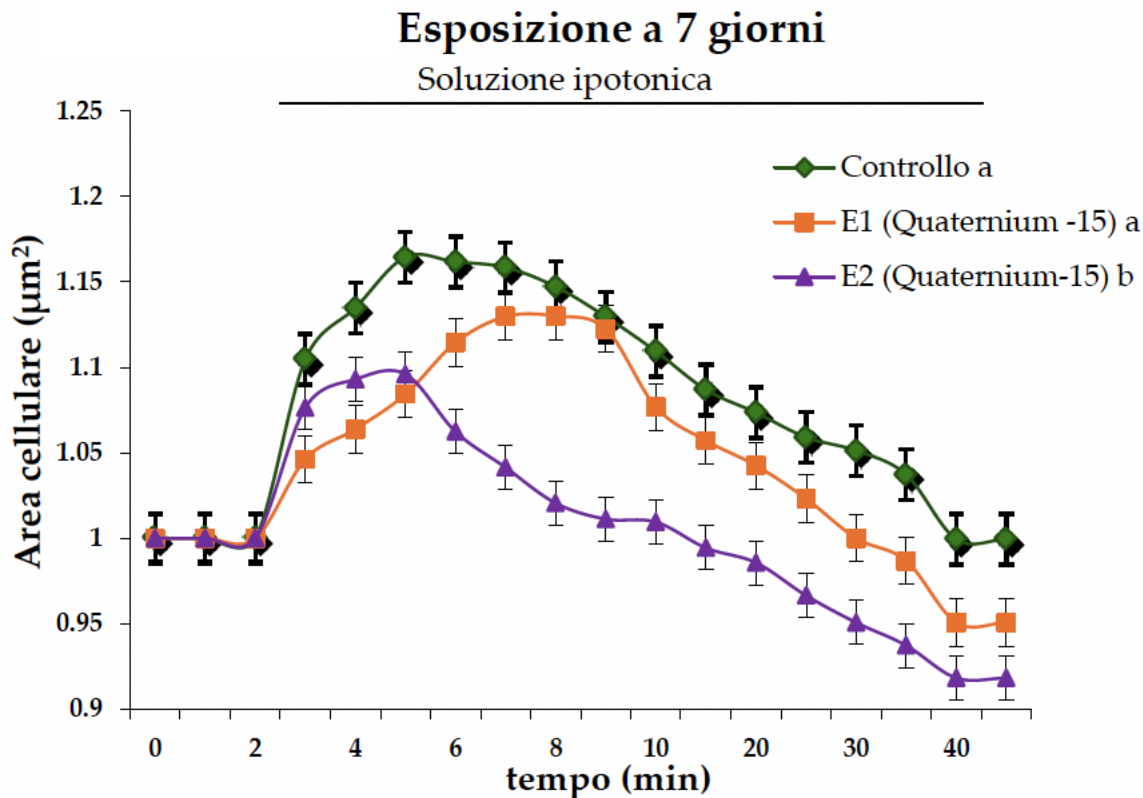


Figura 29: Andamento temporale delle variazioni volumetriche in cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* sottoposte a trattamento con Quaternium-15 (E1: 0,5 mg/L; E2: 1 mg/L) per una settimana. Le curve rappresentano l'area cellulare media \pm errore standard calcolata su un campione di almeno 15 cellule per gruppo. La simbologia adottata prevede: rombi (\blacklozenge) per il gruppo controllo, quadrati (\blacksquare) per il trattamento E1, triangoli (\blacktriangle) per il trattamento E2. L'elaborazione statistica è stata condotta mediante ANOVA one-way con successivo test post-hoc di Tukey. Lettere differenti indicano significatività statistica ($p < 0,05$).

Il prolungamento dell'esposizione a quattordici giorni ha comportato un deterioramento progressivo della funzionalità osmoregolativa (Figura 30). Le cellule del gruppo E1 hanno sviluppato un pattern di risposta bifasico anomalo, caratterizzato da un iniziale

picco di rigonfiamento (15,0% a IPO2), seguito da una fase di parziale recupero e da un secondo rigonfiamento a IPO8 (10,8%), senza il ritorno al volume basale. Sebbene questa alterazione non abbia raggiunto la significatività statistica, rappresenta un chiaro indicatore di compromissione funzionale. Il gruppo E2 ha confermato la severa disfunzione osmoregolativa già osservata a 7 giorni, con un rigonfiamento limitato (11,6%) e l'incapacità di recupero volumetrico, risultando significativamente diverso sia dal controllo ($p < 0,05$) che dal gruppo E1 ($p < 0,01$). Questo pattern suggerisce una progressiva compromissione dei meccanismi cellulari deputati alla regolazione del volume, indicativa di una tossicità sistemica a carico della funzionalità cellulare.

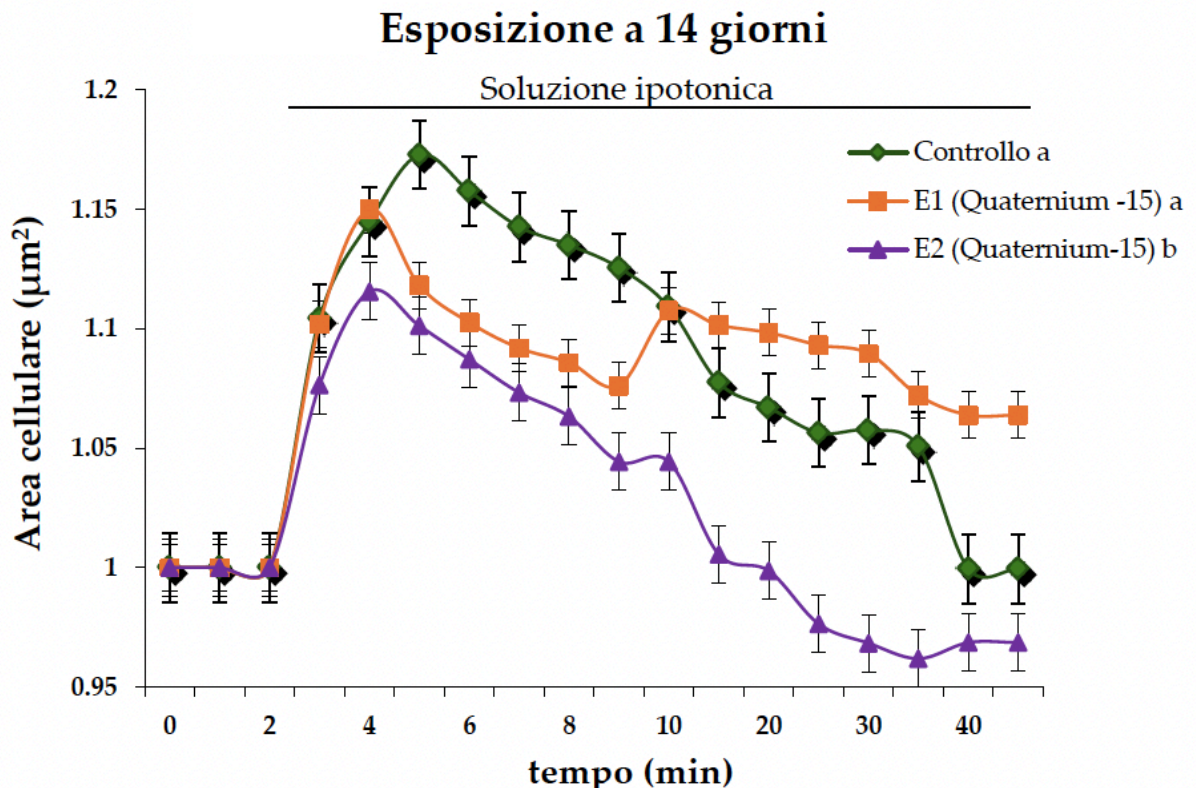


Figura 30: Andamento temporale delle variazioni volumetriche in cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* in seguito a esposizione prolungata (14 giorni) al Quaternium-15 (E1: 0,5 mg/L; E2: 1 mg/L). I dati riportano l'area cellulare media

± errore standard determinata su un minimo di 15 cellule per ciascun gruppo sperimentale. I simboli utilizzati sono: rombi (◆) per il controllo, quadrati (■) per il gruppo E1, triangoli (▲) per il gruppo E2. L'analisi statistica è stata effettuata tramite ANOVA one-way seguita da test post-hoc di Tukey. Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

5.3.2. *Pinctada imbricata*

I dettagli metodologici e i risultati completi di questo studio sono consultabili nell'articolo: Multisanti et al., 2023b, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 101, 104198. Di seguito è riportata la prima pagina dell'articolo.

Environmental Toxicology and Pharmacology 101 (2023) 104198



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

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

In questo studio, gli emociti di *P. imbricata* sono stati esposti *in vitro* al Quaternium-15 a due concentrazioni (E1: 0,1 mg/L; E2: 1 mg/L) per valutare gli effetti citotossici acuti a diversi tempi di esposizione (30 minuti, 1 ora, 24 ore).

L'analisi della vitalità degli emociti ha evidenziato una risposta dose- e tempo-dipendente all'esposizione al Quaternium-15, con effetti citotossici manifesti fin dai primi momenti di contatto. Già dopo 30 minuti di esposizione, entrambi i saggi

colorimetrici hanno rivelato una significativa compromissione della vitalità cellulare (Tabella 3). Il test TB ha mostrato una riduzione della vitalità al 94,0% nel gruppo E1 e al 92,3% nel gruppo E2, rispetto al 98,7% del controllo. Parallelamente, il saggio NR ha evidenziato valori del 94,8% (E1) e 91,8% (E2) contro il 98,7% del controllo, con differenze statisticamente significative per entrambe le concentrazioni ($p < 0,05$ per E1 e $p < 0,01$ per E2).

Tabella 3: Valutazione della vitalità cellulare negli emociti di *P. imbricata* esposti a Quaternium-15 a due concentrazioni (E1: 0,1 mg/L; E2: 1 mg/L) per diversi tempi di esposizione (30 min, 1 h, 24 h). I saggi di vitalità sono stati condotti mediante test di esclusione del Trypan Blue (TB) e saggio di ritenzione del Rosso Neutro (NR).

Saggio	Tempo	Controllo	E1 (0,1 mg/L)	E2 (1 mg/L)
TB	30 min	98,7 ± 0,8 ^a	94,0 ± 1,7 ^b	92,3 ± 4,2 ^b
NR	30 min	98,7 ± 0,8 ^a	94,8 ± 0,8 ^b	91,8 ± 1,0 ^b
TB	1 h	98,5 ± 0,8 ^a	91,8 ± 1,7 ^b	88,2 ± 4,3 ^b
NR	1 h	98,5 ± 0,8 ^a	91,5 ± 2,1 ^b	87,2 ± 4,6 ^b
TB	24 h	99,0 ± 0,7 ^a	87,3 ± 3,9 ^b	86,5 ± 3,6 ^b
NR	24 h	99,0 ± 0,7 ^a	88,0 ± 4,0 ^b	86,0 ± 2,6 ^b

I valori sono espressi come percentuale media di vitalità ± errore standard. L'analisi statistica è stata condotta con ANOVA one-way seguita da test post-hoc di Tukey. Lettere diverse indicano significatività statistica ($p < 0,05$). I valori significativamente diversi dal controllo sono evidenziati in grassetto.

L'estensione dell'esposizione a 1 ora ha determinato un ulteriore deterioramento della vitalità cellulare. Il test TB ha registrato riduzioni al 91,8% (E1) e 88,2% (E2), mentre il

saggio NR ha mostrato valori del 91,5% (E1) e 87,2% (E2), tutti significativamente inferiori ai rispettivi controlli che mantenevano vitalità superiori al 98%. Dopo 24 ore di esposizione, il danno cellulare ha raggiunto il suo massimo, con entrambe le metodologie che hanno evidenziato una marcata compromissione della vitalità. Il test TB ha rivelato valori minimi del 87,3% (E1) e 86,5% (E2) rispetto al 99,0% del controllo. Analogamente, il saggio NR ha mostrato una vitalità del 88,0% (E1) e 86,0% (E2) contro il 99,0% del controllo, con tutte le differenze statisticamente significative ($p < 0,01$). Interessante notare come, nonostante la chiara tendenza dose-dipendente degli effetti, non sono emerse differenze statisticamente significative tra le due concentrazioni testate in nessuno dei tempi analizzati, suggerendo che entrambe le concentrazioni superano la soglia di tossicità acuta per gli emociti di *P. imbricata*.

L'attività fagocitaria degli emociti ha mostrato una compromissione severa e progressiva correlata sia alla concentrazione che al tempo di esposizione al Quaternium-15. Dopo 30 minuti di esposizione, entrambi i gruppi trattati hanno evidenziato una significativa riduzione della capacità fagocitaria rispetto al controllo (Figura 31, Figura 32). Inoltre, è emersa una differenza statisticamente significativa tra E1 ed E2, indicando un effetto dose-dipendente già presente nelle prime fasi dell'esposizione. A 60 minuti, il pattern di compromissione si è intensificato, con il gruppo E2 che ha mostrato una riduzione significativamente maggiore rispetto sia al controllo che al gruppo E1. La capacità fagocitaria del gruppo E1, pur rimanendo ridotta rispetto al controllo, non ha raggiunto la significatività statistica.

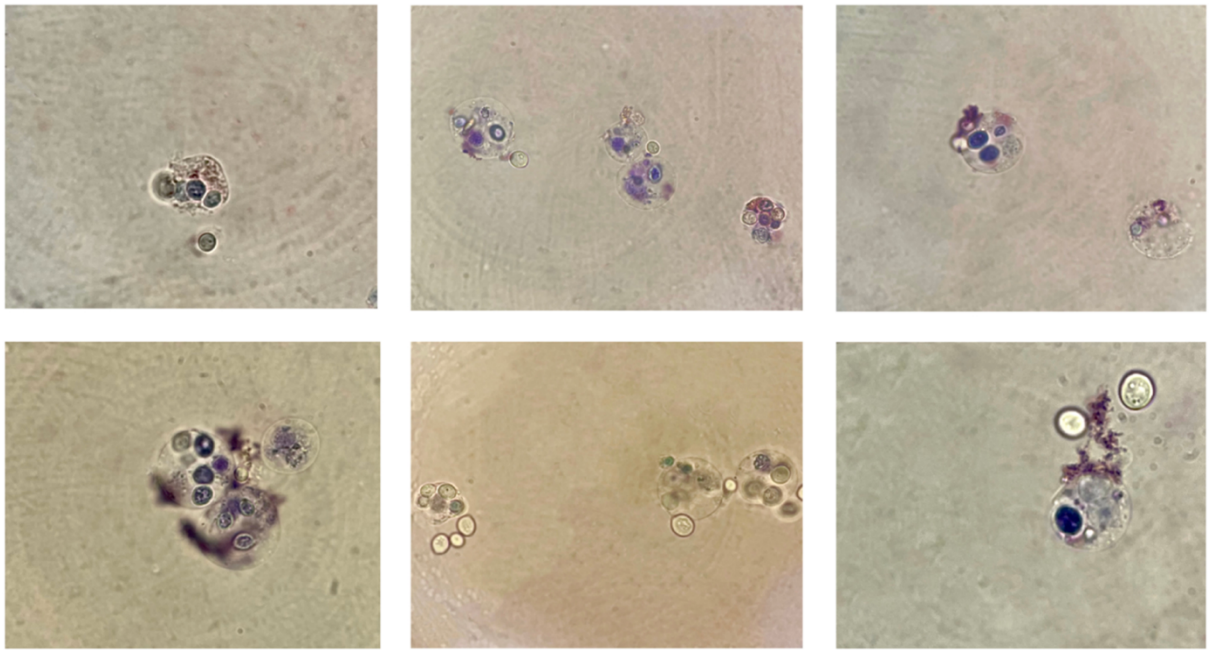


Figura 31: Immagini microscopiche rappresentative dell'attività fagocitaria degli emociti di *P. imbricata* esposti a Quaternium-15. Le acquisizioni sono state effettuate mediante camera CCD (DVC Canada colour 1300, 12-bit cooled, slow-scan) collegata al microscopio (ingrandimento 1000X) dopo 30 min di esposizione. *P. imbricata* è stata utilizzata come specie modello per la documentazione fotografica dell'attività fagocitaria. Le microfotografie illustrano la presenza di *S. cerevisiae* internalizzato e la morfologia cellulare in condizioni di esposizione.

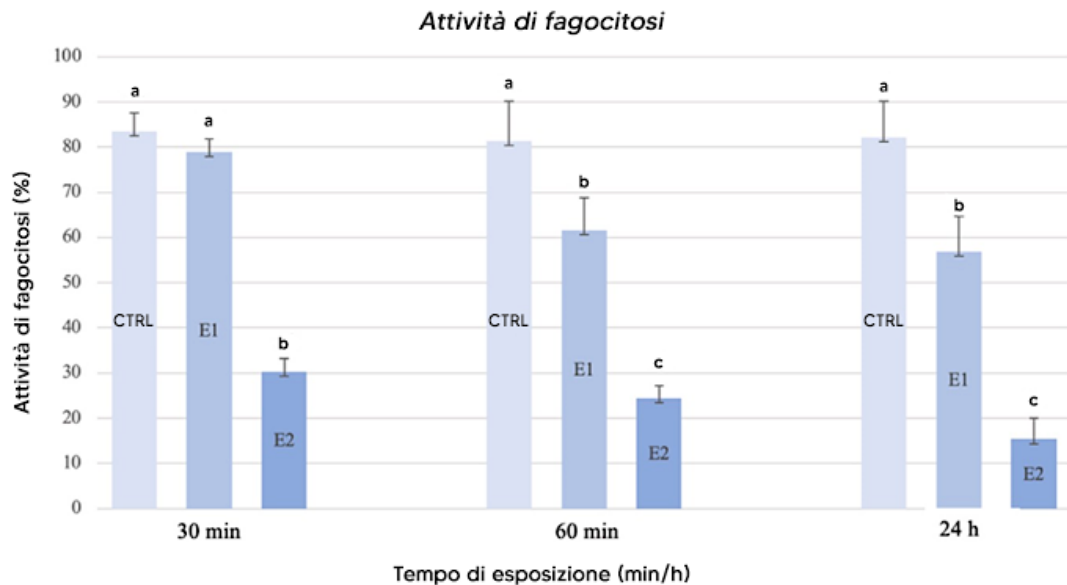


Figura 32: Rappresentazione istografica dell'attività fagocitaria degli emociti di *P. imbricata* sottoposti a trattamento con due diverse concentrazioni di Quaternium-15 (E1: 0,1 mg/L; E2: 1 mg/L) valutata a tre intervalli temporali distinti (T1: 30 min; T2:

60 min; T3: 24 ore). L'elaborazione statistica dei dati è stata condotta attraverso analisi della varianza a una via (ANOVA) con successivo test post hoc di Tukey. I valori sono riportati come percentuale di cellule che hanno manifestato capacità fagocitaria. Le differenze statisticamente rilevanti sono contraddistinte da lettere diverse ($p < 0,05$).

Dopo 24 ore di esposizione, entrambi i gruppi trattati hanno presentato una drammatica riduzione dell'attività fagocitaria, con differenze significative sia rispetto al controllo che tra i due trattamenti. Il gruppo E2 ha mostrato la compromissione più severa, confermando l'effetto dose-dipendente dell'azione tossica del Quaternium-15.

L'analisi temporale ha rivelato differenze significative nell'attività fagocitaria del gruppo E1 tra 30 minuti e gli altri tempi di esposizione (60 minuti e 24 ore). Similmente, il gruppo E2 ha mostrato una progressiva riduzione significativa della funzione fagocitaria tra tutti i tempi di esposizione testati, evidenziando un deterioramento continuo della funzionalità immunitaria nel tempo.

5.4. Esposizione al PVA

I dettagli metodologici e i risultati completi di questo studio sono consultabili nell'articolo: Multisanti et al., 2025c, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 298, 118336.

Di seguito è riportata la prima pagina dell'articolo.



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

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

Personal care products as a potential source of aquatic pollution: Effect of polyvinyl alcohol on physiological and antioxidant responses in *Mytilus galloprovincialis*

Cristiana Roberta Multisanti ^{a,1} , Giorgia Zicarelli ^{b,1} , Alessia Caferro ^c, Mariacristina Filice ^c, Jana Blahova ^d, Irene Vazzana ^e, Giuseppe Piccione ^a, Sandra Imbrogno ^{c,*}, Caterina Faggio ^{b,f,**} , Federica Impellitteri ^a

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

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

^c Department of Biology, Ecology and Earth Science, University of Calabria, Rende 87036, Italy

^d Department of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno,

Palackého tr. 1946/1, Brno 612 42, Czech Republic

^e Zooprofylactic Institute of Sicily, Via Gino Marinuzzi, Palermo 90129, Italy

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

Il presente studio ha valutato gli effetti del PVA (alcool polivinilico) su esemplari di *M. galloprovincialis* esposti per 14 giorni a due concentrazioni sperimentali: E1 (0,1 mg/L) ed E2 (10 mg/L).

La valutazione della vitalità cellulare mediante colorazioni TB e NR ha evidenziato risposte differenziate tra emociti e cellule della ghiandola digestiva (Tabella 4). Gli emociti hanno manifestato una lieve diminuzione della vitalità in entrambe le concentrazioni testate rispetto al gruppo controllo. Tale decremento ha raggiunto significatività statistica ($p < 0,05$) esclusivamente nel saggio TB per la concentrazione più elevata (E2: 10 mg/L), dove si è registrata una vitalità del $98,0 \pm 0,7\%$ contro il $99,8 \pm 0,1\%$ del controllo.

Le cellule della ghiandola digestiva hanno dimostrato una maggiore resistenza all'esposizione, mantenendo percentuali di vitalità superiori al 99% in entrambi i saggi colorimetrici. L'unica variazione significativa è stata rilevata nel test NR per il gruppo E2

(99,0 ± 0,3% vs 99,8 ± 0,1% del controllo; $p < 0,05$). Non sono emerse differenze statisticamente rilevanti tra le due concentrazioni sperimentali in nessuno dei comparti cellulari analizzati.

Tabella 4. Valutazione della vitalità cellulare di emociti e cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* mediante saggi colorimetrici TB e NR dopo esposizione a PVA.

Gruppi Sperimentali	Saggio	Controllo	E1 (0,1 mg/L)	E2 (10 mg/L)
Emociti	TB	99,8 ± 0,1	98,7 ± 0,4	98,0 ± 0,7*
	NR	99,3 ± 0,4	98,4 ± 0,5	98,3 ± 0,3
Cellule della ghiandola digestiva	TB	99,5 ± 0,3	99,5 ± 0,2	98,7 ± 0,3
	NR	99,8 ± 0,1	99,4 ± 0,1	99,0 ± 0,3*

I valori sono espressi come percentuale media ± errore standard. Analisi statistica: ANOVA a una via seguita da test post hoc di Tukey. * $p < 0,05$ vs controllo.

L'analisi della capacità di regolazione del volume cellulare delle cellule della ghiandola digestiva ha rivelato alterazioni nell'omeostasi osmotica, seppur non statisticamente significative. Le cellule esposte a PVA hanno mostrato pattern di rigonfiamento irregolari rispetto al controllo, particolarmente evidenti nel gruppo E2, caratterizzato da un'incapacità di recupero del volume fisiologico dopo shock ipotonico (Figura 33). I due gruppi sperimentali hanno manifestato andamenti temporali opposti: le cellule E1 hanno iniziato una fase di contrazione a partire da IPO12, mentre quelle E2 hanno mantenuto uno stato di rigonfiamento persistente anche dopo IPO15. Il picco massimo di rigonfiamento è risultato inferiore nei trattamenti (19,8% in IPO5) rispetto al controllo (20,5% in IPO6), suggerendo un'alterazione dei meccanismi di trasporto ionico e della permeabilità di membrana.

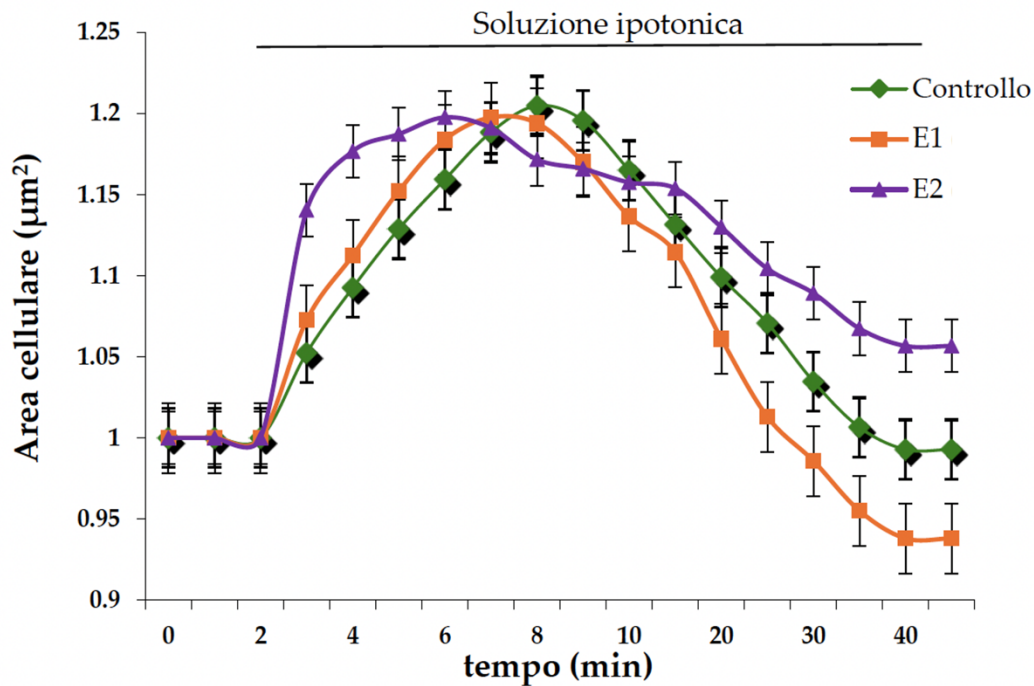


Figura 33: Andamento della regolazione del volume cellulare (RVD) in cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* sottoposte a trattamento con PVA a due diverse concentrazioni (E1: 0,1 mg/L; E2: 10 mg/L). I valori rappresentano la media \pm errore standard calcolati su un minimo di 15 cellule selezionate per gruppo sperimentale. La rappresentazione grafica utilizza simboli differenti: rombi (\blacklozenge) per il controllo, quadrati (\blacksquare) per E1 e triangoli (\blacktriangle) per E2. L'elaborazione statistica è stata condotta mediante ANOVA a una via con successivo test post hoc di Tukey. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi trattati e il controllo.

L'analisi morfometrica del bisso non ha evidenziato variazioni statisticamente significative nel numero di placche dopo quattordici giorni di esposizione rispetto al gruppo controllo, sia per E1 che per E2 (Tabella 5). Tuttavia, è stata osservata una riduzione graduale concentrazione-dipendente nel numero medio di placche nei gruppi trattati (controllo: $66,3 \pm 11,4$; E1: $62,5 \pm 8,70$; E2: $55,5 \pm 13,17$), suggerendo una possibile compromissione della capacità di produzione delle strutture adesive.

Tabella 5. Numero medio e lunghezza media delle placche bissali di *M. galloprovincialis* esposti a PVA a due concentrazioni e gruppo controllo.

Parametri	Controllo (0 mg/L)	E1 (0,1 mg/L)	E2 (10 mg/L)
Numero placche bissali	66,3 ± 11,4 ^a	62,5 ± 8,70 ^a	55,5 ± 13,17 ^a
Lunghezza placche bissali (mm)	0,6 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,03 ^a	0,9 ± 0,03 ^b

Le analisi sono state condotte in quadruplicato ed elaborate mediante ANOVA a una via seguita da test post hoc di Tukey. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

Per contro, la lunghezza delle placche bissali ha mostrato un incremento significativo nel gruppo E2 (0,9 ± 0,03 mm) rispetto sia al controllo (0,6 ± 0,1 mm) che al gruppo E1 (0,5 ± 0,03 mm) ($p < 0,01$ per entrambi i confronti) dopo due settimane di esposizione. Tale incremento rappresenta un aumento del 50% rispetto ai valori basali, indicando alterazioni nei processi di secrezione e organizzazione delle proteine bissali. Le differenze morfologiche nelle dimensioni e nel numero delle placche bissali tra i diversi gruppi sperimentali sono documentate nella Figura 34, che illustra chiaramente le modificazioni strutturali indotte dall'esposizione a PVA.

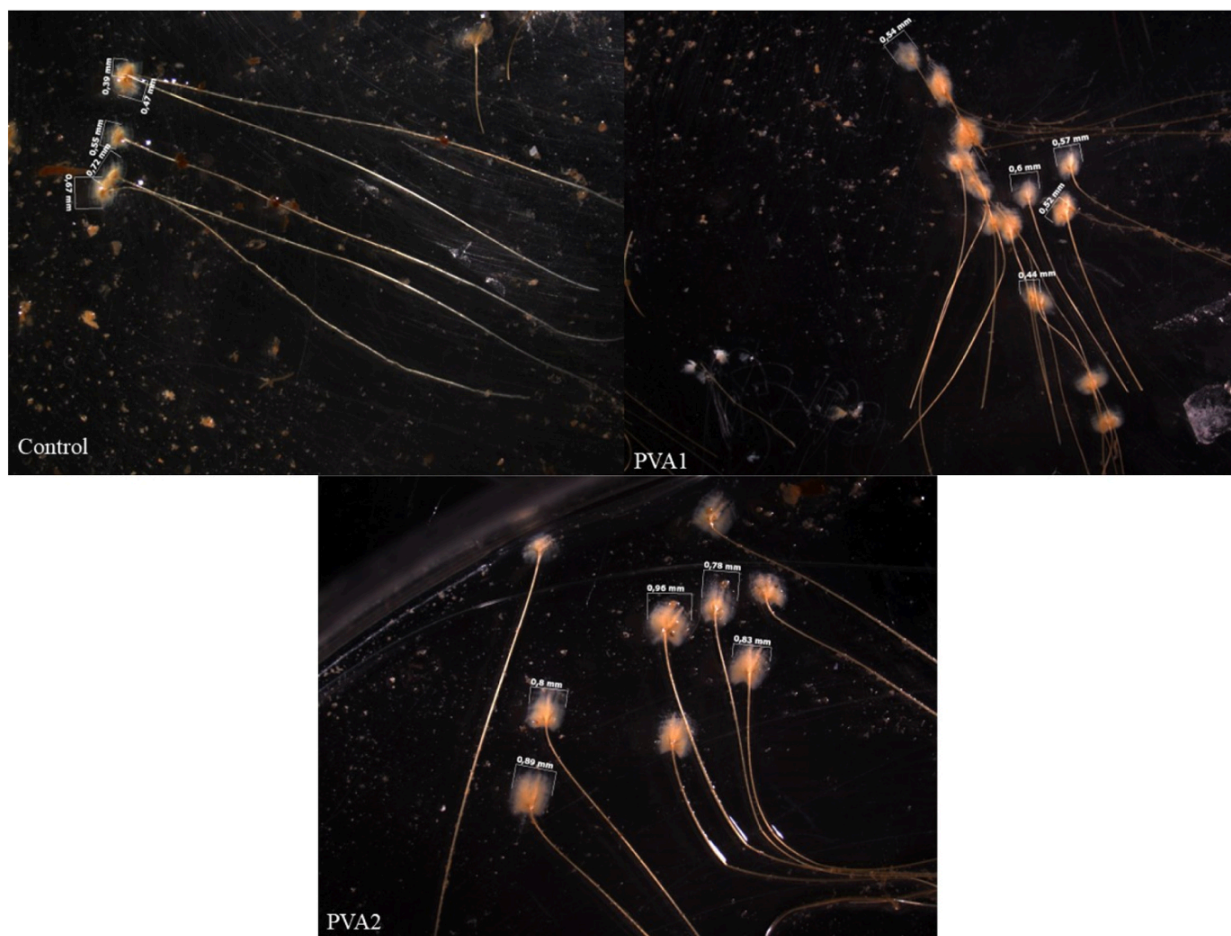


Figura 34: Effetti dell'esposizione a PVA a due concentrazioni (E1: 0,1 mg/L; E2: 10 mg/L) sulle placche bissali di *M. galloprovincialis*. Le immagini rappresentano le variazioni nel numero medio e nella lunghezza delle placche bissali dopo due settimane di trattamento. Acquisizioni effettuate mediante stereomicroscopio AxioCam Mrc 5.

Le determinazioni biochimiche condotte sull'emolinfa al termine del periodo di esposizione di due settimane non hanno evidenziato alterazioni significative nella maggior parte dei parametri analizzati, con valori sostanzialmente comparabili tra i gruppi sperimentali (Tabella 6). Gli elettroliti principali (sodio, potassio, cloro, magnesio e calcio) e l'attività della lattato deidrogenasi (LDH) non hanno mostrato variazioni statisticamente rilevanti rispetto al controllo. L'eccezione è rappresentata dal fosforo, che ha evidenziato un incremento marcato e statisticamente significativo negli animali

esposti alla concentrazione più elevata (E2: $8,0 \pm 5,0$ mg/dL vs controllo: $1,9 \pm 0,1$ mg/dL; $p < 0,05$), suggerendo un'alterazione del metabolismo fosforico sistemico.

Tabella 6: Concentrazioni elettrolitiche e attività LDH nell'emolinfa di *M. galloprovincialis* dopo esposizione di quattordici giorni a PVA a due diverse concentrazioni (E1: 0,1 mg/L; E2: 10 mg/L) e gruppo controllo.

Parametri	Controllo	E1 (0,1 mg/L)	E2 (10 mg/L)
Sodio (mmol/L)	$551,3 \pm 9,7^a$	$530,7 \pm 21,9^a$	$542,3 \pm 11,6^a$
Potassio (mmol/L)	$14,0 \pm 0,3^a$	$13,6 \pm 1,1^a$	$13,78 \pm 1,1^a$
Cloro (mmol/L)	$590,3 \pm 12,8^a$	$577,7 \pm 29,4^a$	$590,1 \pm 10,7^a$
Fosforo (mg/dL)	$1,9 \pm 0,1^a$	$2,3 \pm 0,9^a$	$8,0 \pm 5,0^b$
Magnesio (mg/dL)	$123,2 \pm 7,6^a$	$128,1 \pm 3,4^a$	$128,4 \pm 3,4^a$
Calcio (mg/dL)	$47,0 \pm 2,9^a$	$46,0 \pm 1,6^a$	$48,0 \pm 1,6^a$
Lattato deidrogenasi (U/L)	$3,0 \pm 1,0^a$	$3,5 \pm 1,5^a$	$2,0 \pm 1^a$

I valori sono espressi come media \pm errore standard di sei campioni di emolinfa per gruppo. Analisi statistica: ANOVA a una via seguita da test post hoc di Tukey. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

Per quanto concerne i campioni di acqua di allevamento, l'analisi dei livelli ionici ha fornito un confronto tra le condizioni sperimentali e il controllo, rivelando variazioni minime nei parametri misurati. Coerentemente con i dati dell'emolinfa, anche nell'acqua la concentrazione di fosforo ha rappresentato l'unico parametro significativamente alterato, mostrando un aumento nel gruppo E2 rispetto al controllo e al trattamento E1 (Tabella 7).

Tabella 7: Concentrazioni ioniche nell'acqua di allevamento degli esemplari di *M. galloprovincialis* esposti per quattordici giorni a PVA a due diverse concentrazioni (E1: 0,1 mg/L; E2: 10 mg/L) e gruppo controllo.

Parametri	Controllo	E1 (0,1 mg/L)	E2 (10 mg/L)
Sodio (mmol/L)	$537,9 \pm 45,5^a$	$548,3 \pm 17,1^a$	$548,9 \pm 15,1^a$
Potassio (mmol/L)	$10,8 \pm 0,9^a$	$11,1 \pm 0,3^a$	$11,08 \pm 0,3^a$

Cloro (mmol/L)	576,7 ± 39,2 ^a	586,7 ± 15,8 ^a	587,3 ± 13,4 ^a
Fosforo (mg/dL)	3,0 ± 0,2 ^a	3,0 ± 0,1 ^a	3,8 ± 0,7 ^b
Magnesio (mg/dL)	127,12 ± 6,52 ^a	123,9 ± 0,6 ^a	126,0 ± 1,2 ^a
Calcio (mg/dL)	52,0 ± 2,6 ^a	51,8 ± 1,1 ^a	52,5 ± 1,3 ^a

I valori sono espressi come media ± errore standard di sei campioni d'acqua per gruppo. Analisi statistica: ANOVA a una via seguita da test post hoc di Tukey. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

La valutazione dei parametri di stress ossidativo in *M. galloprovincialis* a seguito dell'esposizione subcronica a PVA ha rivelato alterazioni tessuto-specifiche, con le branchie che hanno mostrato maggiore suscettibilità rispetto alla ghiandola digestiva. L'analisi della perossidazione lipidica (LPO) nelle branchie, quantificata attraverso la determinazione dell'MDA, ha evidenziato un trend di incremento nel gruppo E2, seppur non statisticamente significativo rispetto al controllo (Figura 35).

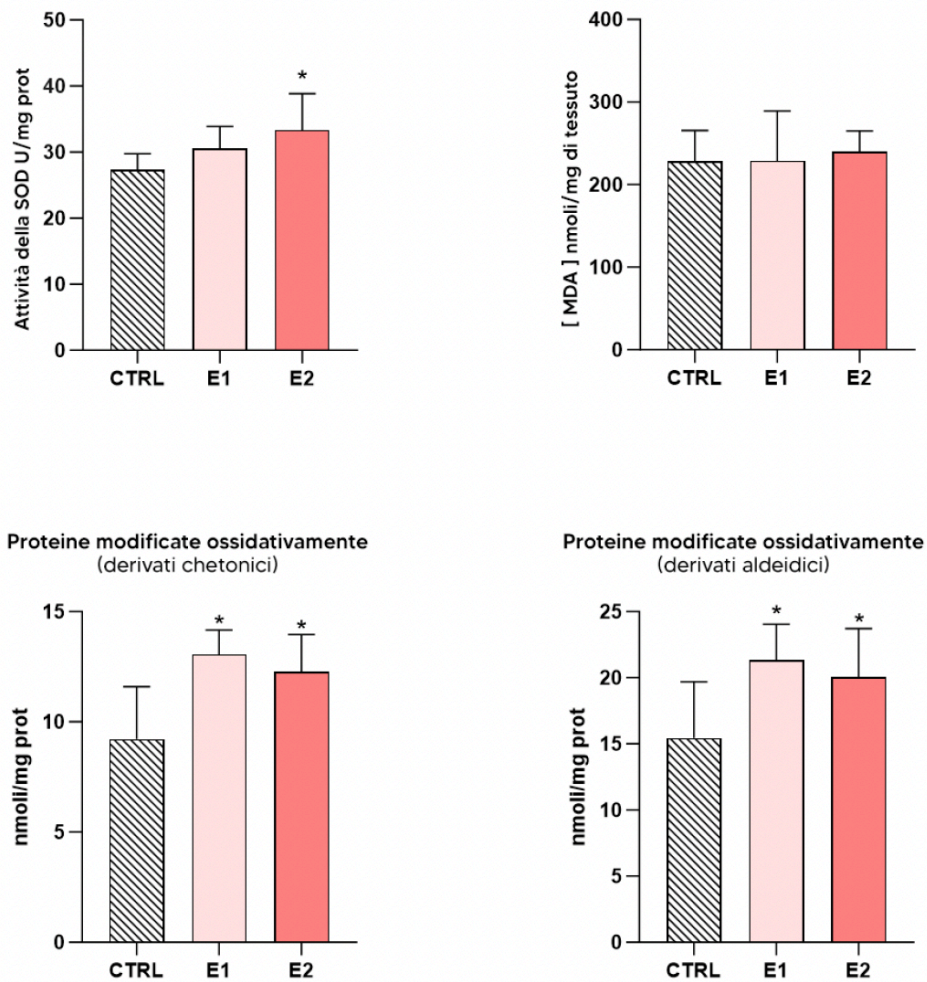


Figura 35: Parametri di stress ossidativo nelle branchie di *M. galloprovincialis* esposte a PVA a due concentrazioni (E1: 0,1 mg/L; E2: 10 mg/L). Rappresentazione istografica dell'attività SOD, dei TBARS quantificati come MDA e degli OMP (derivati chetonici e aldeidici). I valori sono espressi come media \pm errore standard. Analisi statistica: ANOVA a una via seguita da test post hoc di Tukey. * $p < 0,05$ vs controllo. Non sono state osservate differenze significative tra i gruppi trattati.

Tuttavia, i livelli di prodotti di ossidazione delle proteine (OMP) hanno mostrato aumenti significativi ($p < 0,05$) sia per i derivati chetonici che aldeidici in entrambe le concentrazioni testate. Particolarmente interessante è l'osservazione che il gruppo E1 ha registrato valori di OMP superiori rispetto alla concentrazione più elevata (E2), suggerendo una risposta dose-dipendente. L'attività della superossido dismutasi (SOD)

ha mostrato un incremento significativo ($p < 0,05$) esclusivamente nel gruppo E2 dopo 14 giorni di esposizione, indicando l'attivazione di meccanismi di difesa antiossidante in risposta all'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno. Al contrario, le cellule della ghiandola digestiva non hanno manifestato alterazioni significative in nessuno dei parametri ossidativi analizzati (MDA, OMP e SOD) in entrambe le concentrazioni sperimentali ($p > 0,05$), suggerendo una maggiore resistenza di questo tessuto agli effetti pro-ossidanti del PVA.

5.5. Esposizione al PEG

I dettagli metodologici e i risultati completi di questi studi sono consultabili negli articoli: Multisanti et al., 2024, *Antioxidants*, 13(6), 734; Impellitteri et al., 2025b, *Microscopy Research and Technique*, 88:2222–2231. Di seguito è riportata la prima pagina degli articoli in questione.



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 Caferro³, Mariacristina Filice^{3,*}, Caterina Faggio^{2,4}, Irene Vazzana⁵, Jana Blahova⁶, Pavla Lakdawala⁶, Maria Carmela Cerra³, Sandra Imbrogno^{3,*} and Federica Impellitteri¹

- 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..

Microscopy Research and Technique

WILEY

MICROSCOPY
RESEARCH TECHNIQUE

RESEARCH ARTICLE

A Comparative Analysis of Physiological and Morphological Alteration in *Mytilus galloprovincialis* After Exposure to Polyethylene Glycol (PEG)

Federica Impellitteri¹ | Cristiana Roberta Multisanti¹ | Davide Di Paola² | Francesca Inferrera² | Salvatore Cuzzocrea² | Mahdi Banaee³ | Giuseppe Piccione¹ | Caterina Faggio^{2,4} | Marika Cordaro⁵

¹Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Messina, Italy | ²Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical, and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy | ³Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Environment, Behbahan Khatam Alanbia, Behbahan, Iran | ⁴Department of Eco-Sustainable Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Naples, Italy | ⁵Department of Biomedical, Dental and Morphological and Functional Imaging, University of Messina, Messina, Italy

Correspondence: Caterina Faggio (cfaggio@unime.it)

Received: 14 December 2024 | Revised: 7 February 2025 | Accepted: 8 March 2025

I presenti studi hanno valutato gli effetti del PEG (polietilenglicole) su esemplari di *M. galloprovincialis* esposti per 14 giorni a due concentrazioni sperimentali: E1 (0,1 mg/L) ed E2 (10 mg/L).

La valutazione della vitalità degli emociti mediante colorazioni TB e NR ha evidenziato una riduzione dose-dipendente in entrambi i trattamenti rispetto al controllo, che ha mantenuto percentuali di vitalità superiori al 99% in entrambi i saggi. Il gruppo E2 ha mostrato la compromissione più marcata, con una riduzione significativa della vitalità nel test TB ($94,3 \pm 1,0\%$ vs $99,0 \pm 0,1\%$ del controllo; $p < 0,01$), raggiungendo il valore minimo registrato nell'intero esperimento (Tabella 8). Le cellule della ghiandola digestiva hanno manifestato un pattern simile agli emociti. Nel saggio TB, entrambi i gruppi sperimentali hanno evidenziato riduzioni della vitalità rispetto al controllo ($98,7 \pm 0,2\%$), con il gruppo E2 che ha mostrato la compromissione più severa ($93,3 \pm 1,1\%$; $p < 0,01$). Nel test NR, invece, solo il gruppo E1 ha presentato una riduzione statisticamente significativa ($97,3 \pm 0,5\%$ vs $99,4 \pm 0,3\%$ del controllo; $p < 0,05$).

Tabella 8: Valutazione della vitalità cellulare di emociti e cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* trattate con PEG a due concentrazioni per quattordici giorni mediante saggi colorimetrici TB e NR.

Gruppi Sperimentali	Saggio	Controllo	E1 (0,1 mg/L)	E2 (10 mg/L)
Emociti	TB	$99,0 \pm 0,1$	$97,2 \pm 1,0$	$94,3 \pm 1,0^*$
	NR	$99,9 \pm 0,6$	$97,6 \pm 1,1$	$97,4 \pm 1,0$
Cellule della ghiandola digestiva	TB	$98,7 \pm 0,2$	$96,9 \pm 1,0$	$93,3 \pm 1,1^*$
	NR	$99,4 \pm 0,3$	$97,3 \pm 0,5$	$97,9 \pm 0,7$

I valori sono espressi come percentuale media \pm errore standard. Analisi statistica: ANOVA a una via seguita da test post hoc di Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs controllo.

L'analisi della capacità di regolazione del volume cellulare delle cellule della ghiandola digestiva dopo 14 giorni di esposizione non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i gruppi. Tuttavia, sono emerse differenze qualitative negli andamenti temporali (Figura 36).

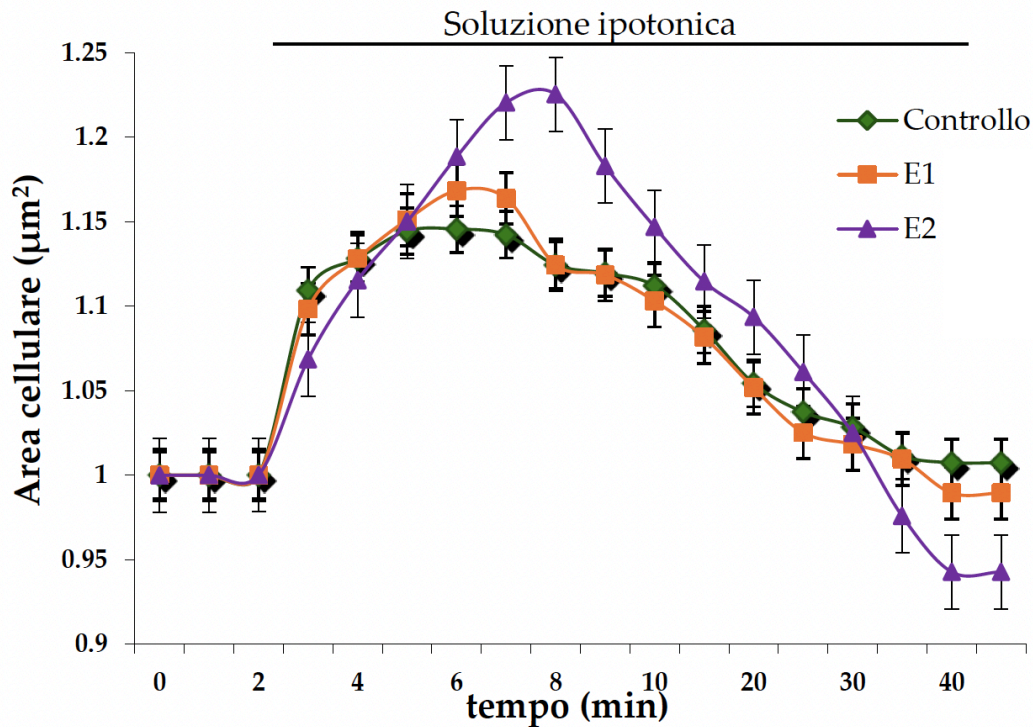


Figura 36: Andamento della regolazione del volume cellulare (RVD) in cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* sottoposte a trattamento con PEG a due diverse concentrazioni (E1: 0,1 mg/L; E2: 10 mg/L). I valori rappresentano la media \pm errore standard calcolati su un minimo di 15 cellule selezionate per gruppo sperimentale. La rappresentazione grafica utilizza simboli differenti: rombi (\blacklozenge) per il controllo, quadrati (\blacksquare) per E1 e triangoli (\blacktriangle) per E2. L'elaborazione statistica è stata condotta mediante ANOVA a una via con successivo test post hoc di Tukey. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra controllo e gruppi trattati.

Il gruppo controllo ha raggiunto il picco massimo di rigonfiamento (14,6%) a IPO4, seguito da un recupero completo del volume iniziale. Al contrario, i gruppi trattati hanno

mostrato pattern alterati caratterizzati da un raggiungimento tardivo del picco di rigonfiamento, con intensità maggiori rispetto al controllo, e una compromessa capacità di recupero volumetrico. Specificamente, il gruppo E1 ha evidenziato il massimo rigonfiamento (16,8%) a IPO5, mentre il gruppo E2 ha registrato il picco più elevato dell'intero esperimento (22,5%) a IPO6, mantenendo successivamente un volume superiore a quello basale per tutta la durata del test, indicando una compromissione dei meccanismi di regolazione osmotica.

L'analisi dei parametri biochimici dell'emolinfa non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra il gruppo controllo e i gruppi sperimentali esposti a PEG. Tuttavia, come riportato in Tabella 9, si è osservato un trend di incremento concentrazione-dipendente per i principali elettroliti (Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+}) nei gruppi trattati. Il sodio ha mostrato un aumento graduale dal controllo (476 ± 22 mmol/L) fino al gruppo E2 ($524 \pm 7,0$ mmol/L), mentre il cloro ha seguito un andamento simile (controllo: 516 ± 21 mmol/L; E2: $563 \pm 0,5$ mmol/L). Anche il fosforo ha evidenziato un incremento nei trattamenti, passando da $0,8 \pm 0,1$ mg/dL nel controllo a $2,0 \pm 0,2$ mg/dL nel gruppo E2. L'attività della lattato deidrogenasi (LDH) è rimasta sostanzialmente invariata in tutti i gruppi sperimentali.

Tabella 9: Parametri biochimici dell'emolinfa di *M. galloprovincialis* ($n = 6$) esposti a PEG a due diverse concentrazioni (0,1 mg/L e 10 mg/L) per 14 giorni.

Parametri emolinfa	Controllo	E1	E2
Sodio (mmol/L)	476 ± 22 mmol/L	503 ± 10 mmol/L	$524 \pm 7,0$ mmol/L
Potassio (mmol/L)	$12 \pm 0,7$ mmol/L	$12 \pm 0,5$ mmol/L	$12 \pm 0,2$ mmol/L
Cloro (mmol/L)	516 ± 21 mmol/L	543 ± 19 mmol/L	$563 \pm 0,5$ mmol/L
Fosforo (mg/dL)	$0,8 \pm 0,1$ mg/dL	$1,7 \pm 0,1$ mg/dL	$2,0 \pm 0,2$ mg/dL
Magnesio (mg/dL)	$116 \pm 3,0$ mg/dL	$114 \pm 3,0$ mg/dL	$117 \pm 0,4$ mg/dL

Calcio (mg/dL)	45 ± 4,0 mg/dL	47 ± 0,6 mg/dL	50 ± 0,1 mg/dL
Lattato deidrogenasi (U/L)	2,0 ± 0,0 U/L	2,0 ± 0,0 U/L	1,5 ± 0,5 U/L

I valori sono espressi come media ± errore standard. Analisi statistica: ANOVA a una via. Non sono state osservate differenze statisticamente significative.

Parallelamente, l'analisi dei parametri elettrolitici dell'acqua di allevamento non ha mostrato variazioni significative tra i gruppi sperimentali (Tabella 10). I valori di Na⁺, K⁺, Cl⁻, Mg²⁺ e Ca²⁺ sono rimasti sostanzialmente stabili in entrambi i gruppi trattati, suggerendo che le variazioni osservate nell'emolinfa non sono correlate a modificazioni della composizione del mezzo di allevamento.

Tabella 10: Parametri biochimici dell'acqua di allevamento dei gruppi controllo, E1 e E2 esposti a PEG.

Parametri acqua	Controllo	E1	E2
Sodio (mmol/L)	477 ± 65 mmol/L	513 ± 18 mmol/L	530 ± 26 mmol/L
Potassio (mmol/L)	10 ± 1,3 mmol/L	10 ± 0,3 mmol/L	11 ± 5,4 mmol/L
Cloro (mmol/L)	510 ± 70 mmol/L	560 ± 18 mmol/L	567 ± 34 mmol/L
Fosforo (mg/dL)	5,0 ± 1,9 mg/dL	7,0 ± 4,1 mg/dL	1,5 ± 1,2 mg/dL
Magnesio (mg/dL)	110 ± 9,0 mg/dL	124 ± 3,0 mg/dL	122 ± 31 mg/dL
Calcio (mg/dL)	41 ± 8,6 mg/dL	47 ± 0,7 mg/dL	50 ± 2,9 mg/dL

I valori sono espressi come media ± errore standard. Analisi statistica: ANOVA a una via. Non sono state osservate differenze statisticamente significative.

La valutazione dei parametri di stress ossidativo nelle branchie di mitili esposti a PEG ha rivelato alterazioni significative in diversi marcatori biochimici (Figura 37). L'attività della superossido dismutasi (SOD) ha mostrato una riduzione significativa negli esemplari trattati con la concentrazione più bassa (E1; $p < 0,05$), mentre i valori registrati nel gruppo E2 sono risultati comparabili a quelli del controllo, suggerendo una risposta non monotona dose-dipendente. La perossidazione lipidica (LPO), quantificata

attraverso i TBARS, ha evidenziato incrementi significativi in entrambe le concentrazioni testate ($p < 0,05$). Tuttavia, è emerso un pattern particolare: i livelli di TBARS nel gruppo E2 erano inferiori rispetto al gruppo E1, pur rimanendo superiori al controllo, indicando una possibile attivazione di meccanismi compensatori alla concentrazione più elevata. L'analisi dei prodotti di ossidazione delle proteine (OMP), sia per i derivati aldeidici che chetonici, non ha evidenziato differenze significative tra le tre condizioni sperimentali, suggerendo che l'esposizione a PEG influenzi prevalentemente i sistemi antiossidanti e la perossidazione lipidica piuttosto che l'ossidazione proteica.

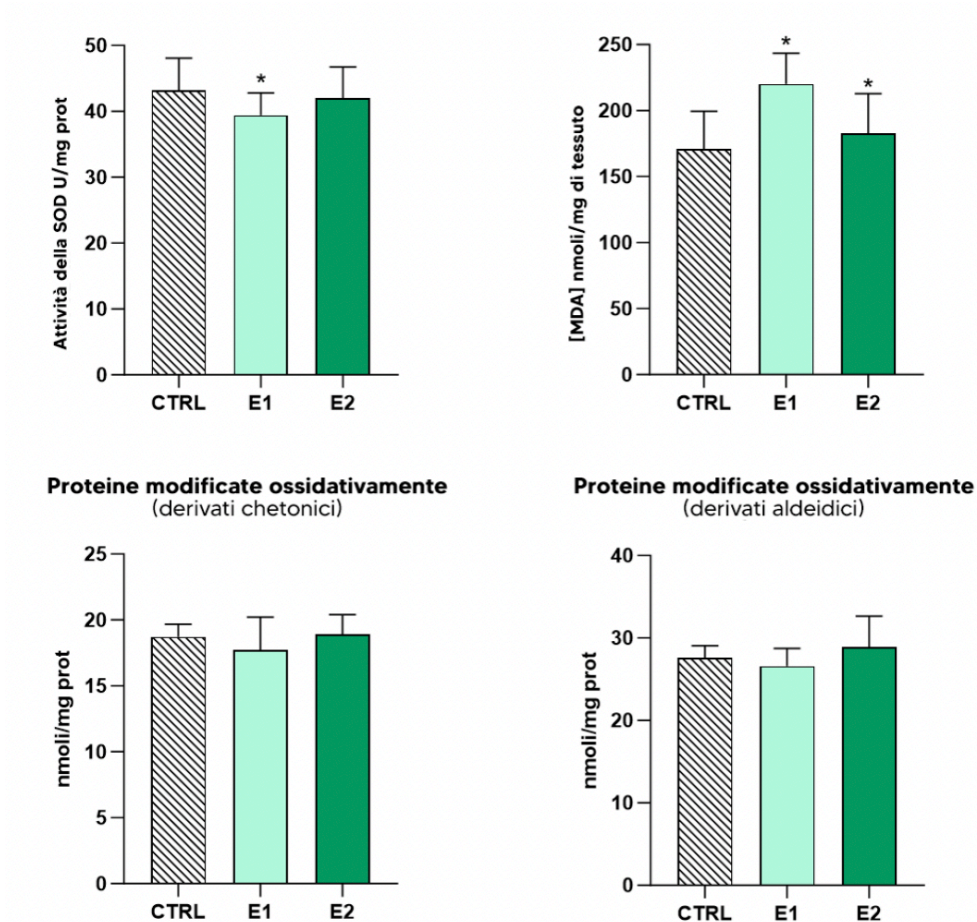


Figura 37: Parametri di stress ossidativo nelle branchie di *M. galloprovincialis* esposte a PEG a due concentrazioni (E1: 0,1 mg/L; E2: 10 mg/L). Rappresentazione istografica dell'attività SOD, dei TBARS e degli OMP (derivati aldeidici e chetonici). I valori

*sono espressi come media \pm errore standard. Analisi statistica: ANOVA a una via seguita da test post hoc di Tukey. * $p < 0,05$ vs controllo.*

L'analisi istologica ha rivelato modificazioni strutturali significative nelle branchie, nell'epatopancreas e nelle gonadi di esemplari maschi e femmine di mitili rispetto ai rispettivi controlli. Le branchie degli esemplari controllo hanno mostrato morfologia normale, con lamelle ben organizzate e assenza di alterazioni epiteliali (Figura 38A e ingrandimento maggiore Figura 38A'). Al contrario, l'istologia delle branchie di mitili esposti sia al gruppo E1 (Figura 38B e ingrandimento maggiore Figura 38B') che E2 (Figura 38C e ingrandimento maggiore Figura 38C') ha evidenziato alterazioni epiteliali con lamelle disorganizzate. In particolare, alcune cellule epiteliali sono apparse ipertrofiche e iperplastiche, mentre altre presentavano marcata vacuolizzazione. Infiltrati di emociti e immunociti sono emersi in modo dose-dipendente.

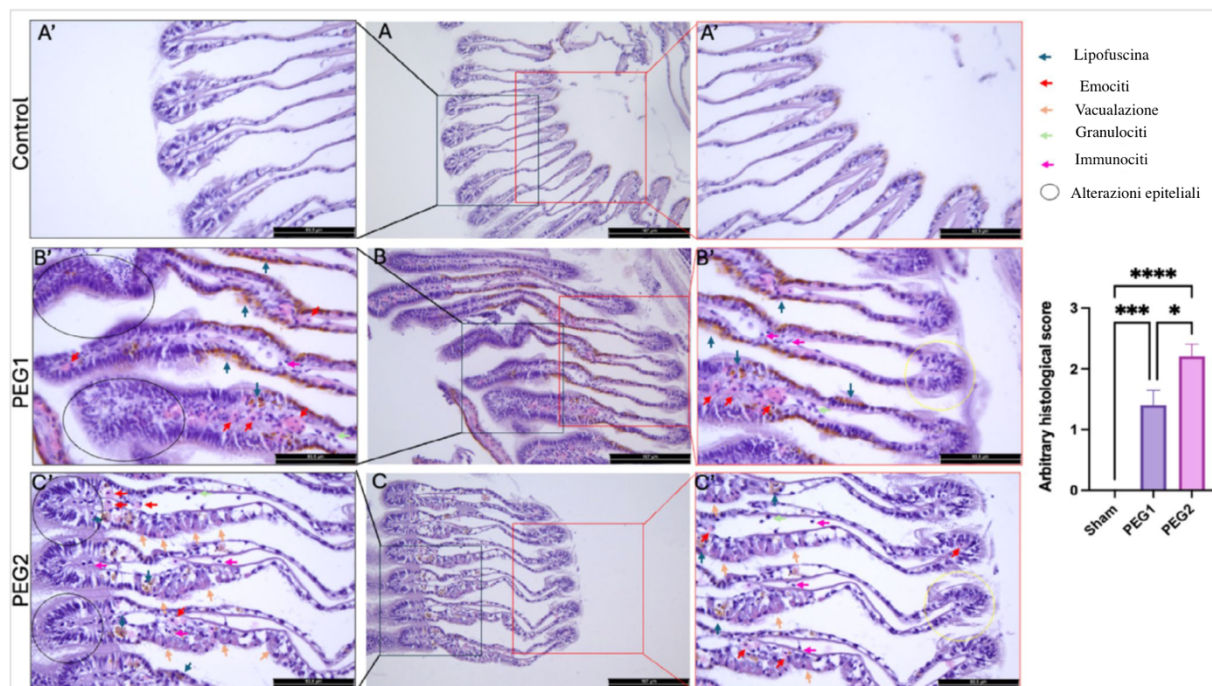


Figura 38: Alterazioni istologiche nelle branchie dopo esposizione a PEG. Colorazione con ematossilina-eosina delle branchie di *M. galloprovincialis* nel gruppo controllo (A), E1 (B) (0,1 mg/L) ed E2 (C) (10 mg/L) dopo 14 giorni di trattamento; ingrandimento $\times 200$ per A, B e C e $\times 400$ per A', B' e C'. Le frecce blu evidenziano aggregati di lipofuscina, le frecce rosse indicano infiltrazioni emocitarie, le frecce arancioni segnalano vacuolizzazione cellulare, le frecce verdi mostrano infiltrazioni granulocitarie, le frecce rosa identificano immunociti, mentre i cerchi neri/gialli delimitano le alterazioni epiteliali.

Mentre i tubuli digestivi, le cellule epiteliali tubulari e i tessuti connettivali stromali dell'epatopancreas prelevati dal controllo presentavano aspetto normale (Figura 39A e ingrandimento maggiore Figura 39A'), i gruppi esposti a E1 (Figura 39B e ingrandimento maggiore Figura 39B') ed E2 (Figura 39C e ingrandimento maggiore Figura 39C') hanno mostrato aggregati di lipofuscina, infiltrazione emocitaria e iperplasia sia nei tubuli digestivi che nei tessuti intertubulari. Alla dose più elevata sono stati osservati danneggiamento tubulare, ipertrofia e foci necrotici, confermando l'effetto tossico dose-dipendente del PEG.

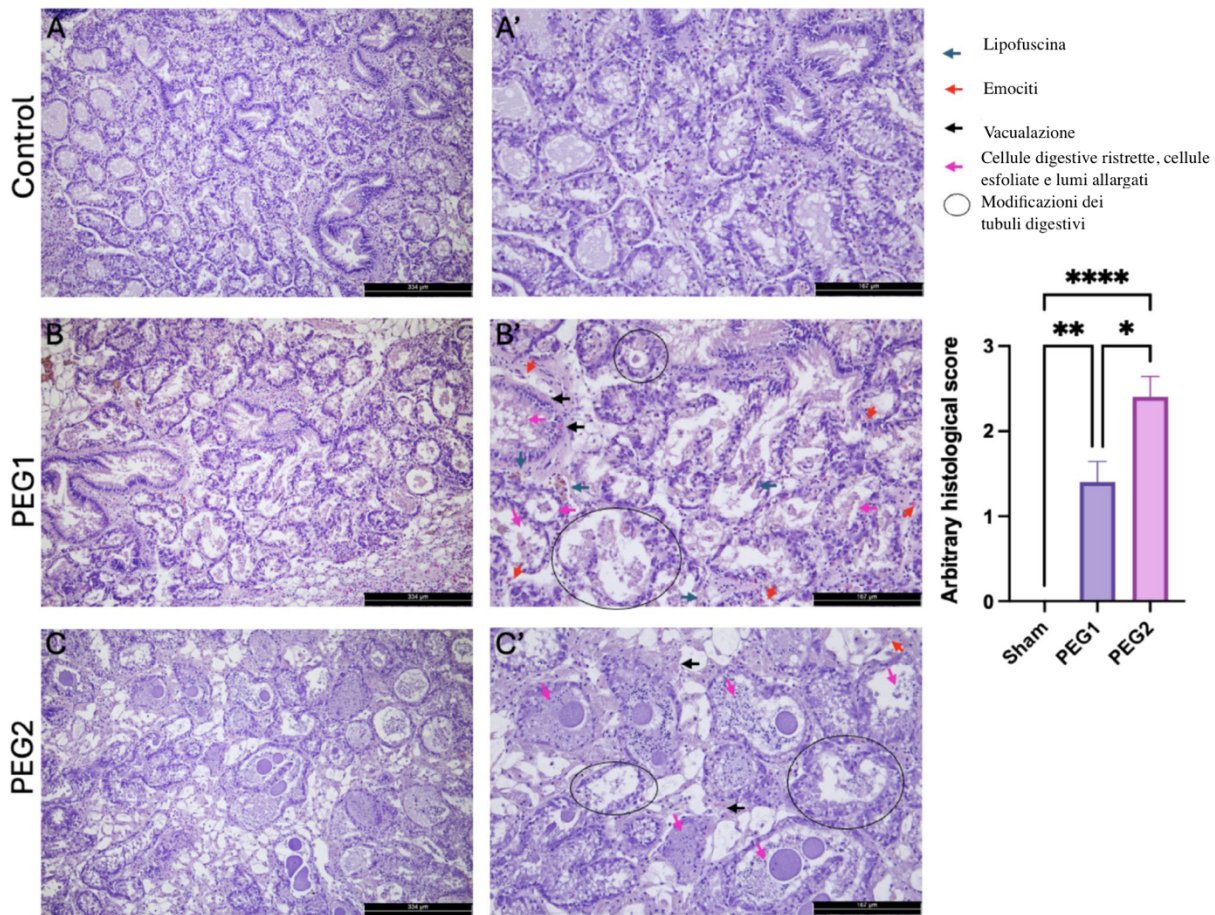


Figura 39: Alterazioni istologiche nell'epatopancreas dopo esposizione a PEG. Colorazione con ematossilina-eosina dell'epatopancreas di *M. galloprovincialis* nel gruppo controllo (A), E1 (B) (0,1 mg/L) ed E2 (C) (10 mg/L) dopo 14 giorni di trattamento; ingrandimento $\times 200$ per A, B e C e $\times 400$ per A', B' e C'. Le frecce blu evidenziano aggregati di lipofuscina, le frecce rosse indicano infiltrazioni emocitarie, le frecce nere segnalano vacuolizzazione cellulare, le frecce rosa identificano cellule digestive ristrette, cellule esfoliate e lumi dilatati, mentre i cerchi neri delimitano le alterazioni dei tubuli digestivi.

Il danno istologico è stato valutato per la prima volta anche a livello gonadico. Come negli altri organi, rispetto al controllo, si apprezzano infiltrazioni emocitarie e aggregati di lipofuscina (Figura 40B,B',C,C' per i maschi e Figura 41B,B',C,C' per le femmine), confermando l'effetto tossico concentrazione-dipendente del PEG. Inoltre, nelle gonadi maschili si verificano alterazioni testicolari, mentre nelle gonadi femminili sono state osservate apoptosi e necrosi degli oociti.

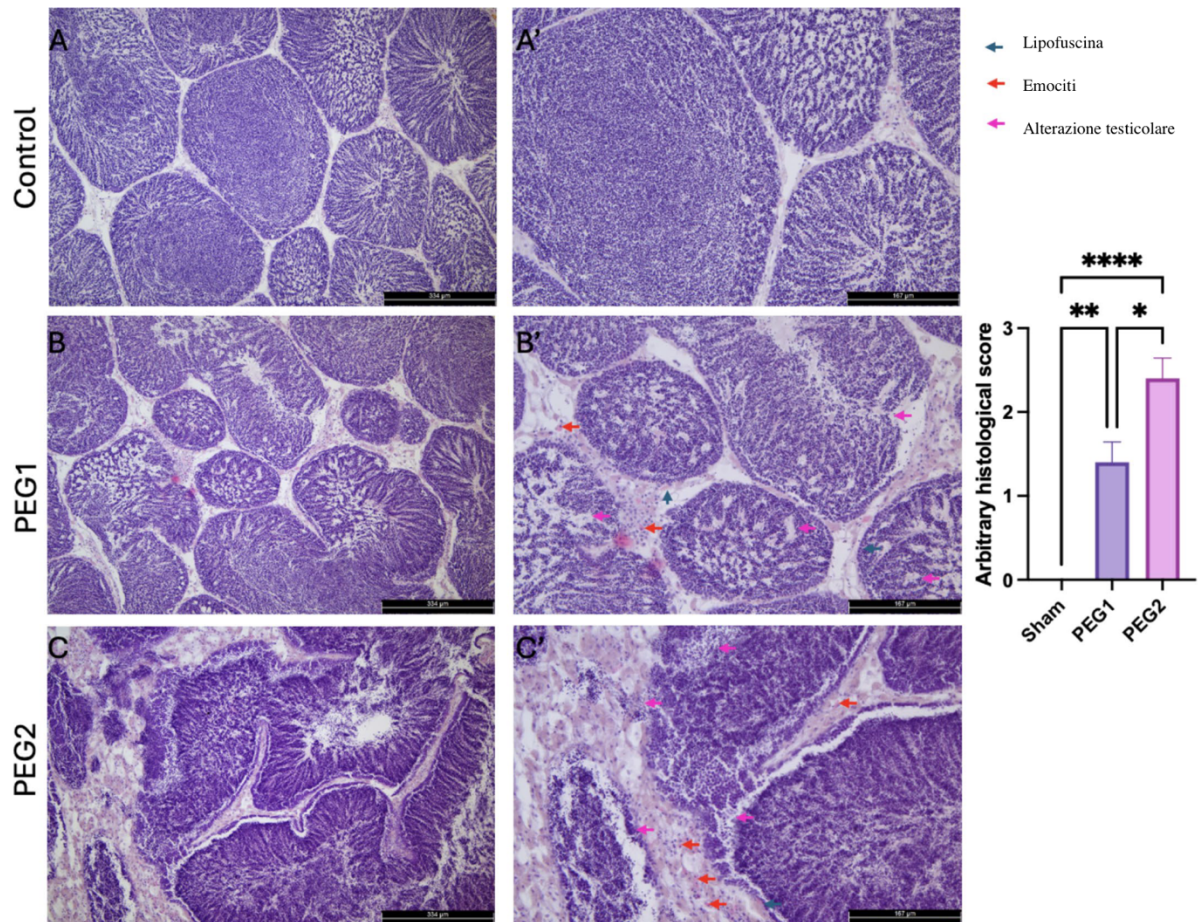


Figura 40: Alterazioni istologiche nelle gonadi maschili di *M. galloprovincialis* dopo esposizione a PEG. Colorazione con ematossilina-eosina delle gonadi maschili di *M. galloprovincialis* nel gruppo controllo (A), E1 (B) (0,1 mg/L) ed E2 (C) (10 mg/L) dopo 14 giorni di trattamento; ingrandimento $\times 200$ per A, B e C e $\times 400$ per A', B' e C'. Le frecce blu evidenziano aggregati di lipofuscina, le frecce rosse indicano infiltrazioni emocitarie, le frecce rosa identificano alterazioni testicolari.

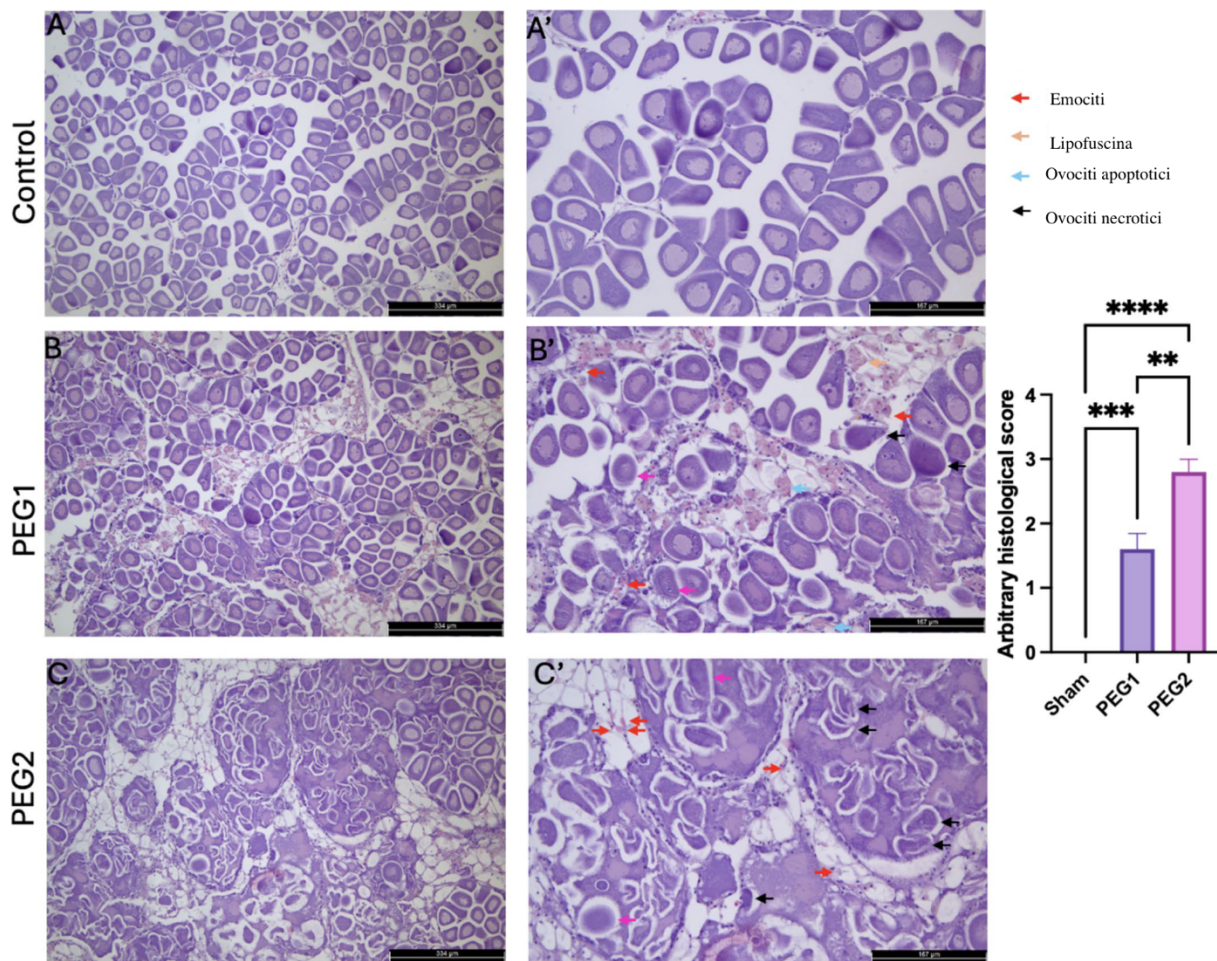


Figura 41: Alterazioni istologiche nelle gonadi femminili di *M. galloprovincialis* dopo esposizione a PEG. Colorazione con ematossilina-eosina delle gonadi femminili di *M. galloprovincialis* nel gruppo controllo (A), E1 (B) (0,1 mg/L) ed E2 (C) (10 mg/L) dopo 14 giorni di trattamento; ingrandimento $\times 200$ per A, B e C e $\times 400$ per A', B' e C'. Le frecce rosse indicano infiltrazioni emocitarie, le frecce arancioni evidenziano aggregati di lipofuscina, le frecce celesti identificano oociti apoptotici e le frecce nere segnalano oociti necrotici.

La colorazione tricromica di Masson ha rivelato strutture di supporto chitinose dei filamenti branchiali. Sono stati osservati emociti all'interno dei filamenti e i filamenti branchiali mostrano un sistema ciliare. È stato possibile dimostrare per la prima volta che, dopo esposizione a PEG in entrambe le dosi (Figura 42C-F), il sistema ciliare appare

disorganizzato e danneggiato, con alterazione dell'architettura epiteliale normale, rispetto al controllo (Figura 42A,B).

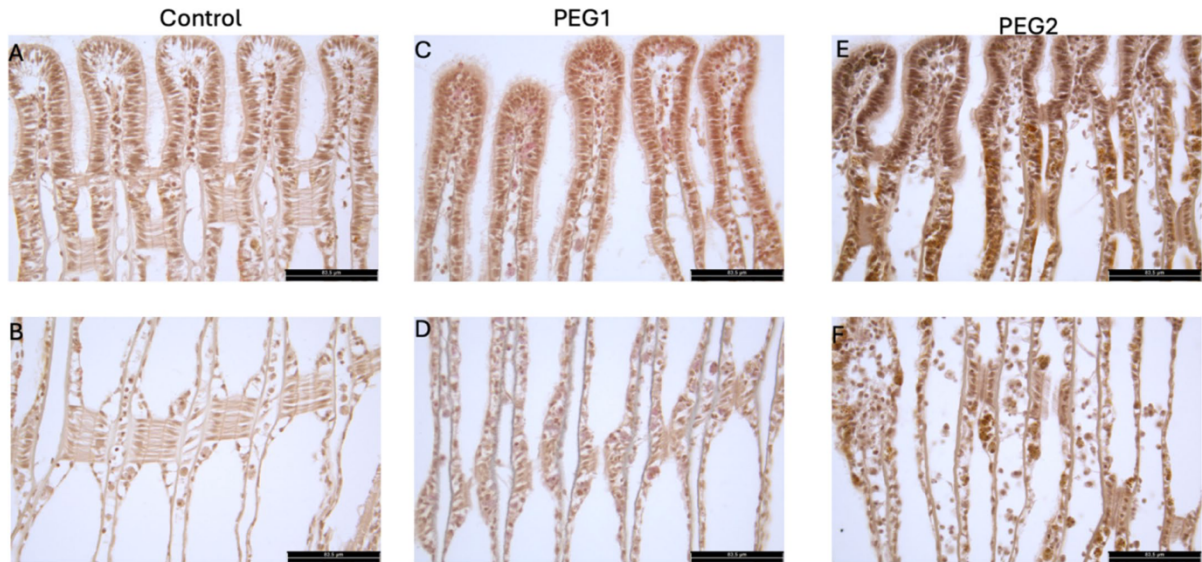


Figura 42: Colorazione tricromica di Masson delle branchie di *M. galloprovincialis*. Immagini rappresentative del gruppo controllo (A, B), E1 (C, D) (0,1 mg/L) ed E2 (E, F) (10 mg/L) dopo 14 giorni di trattamento; ingrandimento $\times 400$.

5.6. Esposizione al Polietilene

I dettagli metodologici e i risultati completi di questi studi sono consultabili negli articoli: Impellitteri et al., 2023b, *Science of the Total Environment*, 890, 164075; Impellitteri et al., 2024c, *Microscopy Research and Technique*, 87(5), 1092-1110. Di seguito è riportata la prima pagina degli articoli in questione.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

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



Physiological and biochemical responses to caffeine and microplastics in *Mytilus galloprovincialis*



F. Impellitteri^a, K. Yunko^b, V. Martyniuk^b, T. Matskiv^{b,c}, S. Lechachenko^b, V. Khoma^b, A. Mudra^c, G. Piccione^a, O. Stoliar^b, C. Faggio^{d,*}

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

^b Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, M. Kryvonosa Str. 2, 46027 Ternopil, Ukraine

^c I. Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Maidan Voli 1, 46001 Ternopil, Ukraine

^d Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale F. Stagno d'Alcontres 31, 98166 Messina, Italy

RESEARCH ARTICLE

MICROSCOPY
RESEARCH TECHNIQUE

WILEY

The odd couple: Caffeine and microplastics. Morphological and physiological changes in *Mytilus galloprovincialis*

Federica Impellitteri¹ | Marilena Briglia² | Caterina Porcino² | Oksana Stoliar³ |
Katerina Yunko³ | Antonino Germanà² | Giuseppe Piccione¹ |
Caterina Faggio^{4,5} | Maria Cristina Guerrero²

¹Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Messina, Italy

²Department of Veterinary Sciences, Zebrafish Neuromorphology Lab, University of Messina, Messina, Italy

³Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine

⁴Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy

⁵Department of Ecosustainable Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Naples, Italy

I presenti studi hanno valutato gli effetti dell'esposizione combinata a microplastiche (MP) e caffeina (Caff) su esemplari di *M. galloprovincialis* per 14 giorni, utilizzando le seguenti condizioni sperimentali: gruppo controllo (C), gruppo caffeina (Caff: 20 µg/L), gruppo microplastiche (MP: 1 mg/L) e gruppo miscela (Mix).

Al termine del periodo di esposizione, gli emociti di tutti i gruppi sperimentali hanno mantenuto elevata stabilità della membrana lisosomiale e alta vitalità (>90%) in entrambi i saggi colorimetrici TB e NR (Tabella 11). Non sono emerse differenze significative rispetto al controllo per nessuno dei trattamenti testati negli emociti. Le cellule della ghiandola digestiva, pur mantenendo percentuali di vitalità superiori al 90%, hanno mostrato variazioni significative tra i gruppi. Il gruppo Caff ha evidenziato una riduzione significativa della vitalità rispetto al controllo nel test NR ($p < 0,05$). Interessante è l'osservazione che tanto il gruppo MP quanto il gruppo Mix hanno mostrato un incremento percentuale della vitalità rispetto al gruppo Caff nel test TB, tendenza confermata con maggiore significatività nel test NR ($p < 0,01$).

Tabella 11: Percentuale di vitalità cellulare di emociti e cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* esposti a caffeina (Caff), microplastiche (MP) e loro miscela (Mix) per 14 giorni mediante saggi TB e NR.

Gruppo Sperimentale	Metodo	Controllo	Caff (20 µg/L)	MP (1 mg/L)	Mix
Emociti	TB	98,84 ± 0,85	98,03 ± 0,74	97,54 ± 0,44	98,01 ± 0,60
	NR	99,33 ± 0,36	97,4 ± 0,81	97,63 ± 0,50	97,78 ± 0,77
Cellule della ghiandola digestiva	TB	99,12 ± 0,89	98,27 ± 0,30	98,40 ± 0,22 ^a	99,29 ± 0,10 ^a
	NR	98,51 ± 0,41	97,44 ± 0,38 [*]	99,48 ± 0,08 ^{aa}	99,47 ± 0,09 ^{aa}

I valori sono espressi come media ± errore standard ($n = 14$ per emociti; $n = 4$ per ghiandola digestiva). Analisi statistica: ANOVA a una via. ^{*} $p < 0,05$ vs controllo; ^a $p < 0,05$, ^{aa} $p < 0,01$ vs gruppo Caff.

Essendo *M. galloprovincialis* un organismo osmoconforme, le cellule della ghiandola digestiva sono in grado di regolare il proprio volume cellulare in presenza di soluzioni ipotoniche. In condizioni fisiologiche, tali cellule sottoposte a shock ipotonico si rigonfiano per poi tornare gradualmente al volume iniziale. Il gruppo Caff ha mostrato un rigonfiamento di circa il 18% quando sottoposto a soluzione ipotonica, simile al controllo (17%). Una volta raggiunto il picco, le cellule sono tornate gradualmente al volume iniziale, mantenendo inalterate le funzioni fisiologiche correlate alla RVD (Figura 43). Il gruppo MP ha evidenziato un comportamento alterato: dopo il rigonfiamento, le cellule hanno subito una contrazione superiore a quella necessaria per tornare al volume iniziale. Il gruppo Mix, pur mantenendo la capacità di rigonfiarsi in presenza di soluzione ipotonica, non è riuscito a recuperare il volume iniziale, mostrando differenze significative rispetto al controllo.

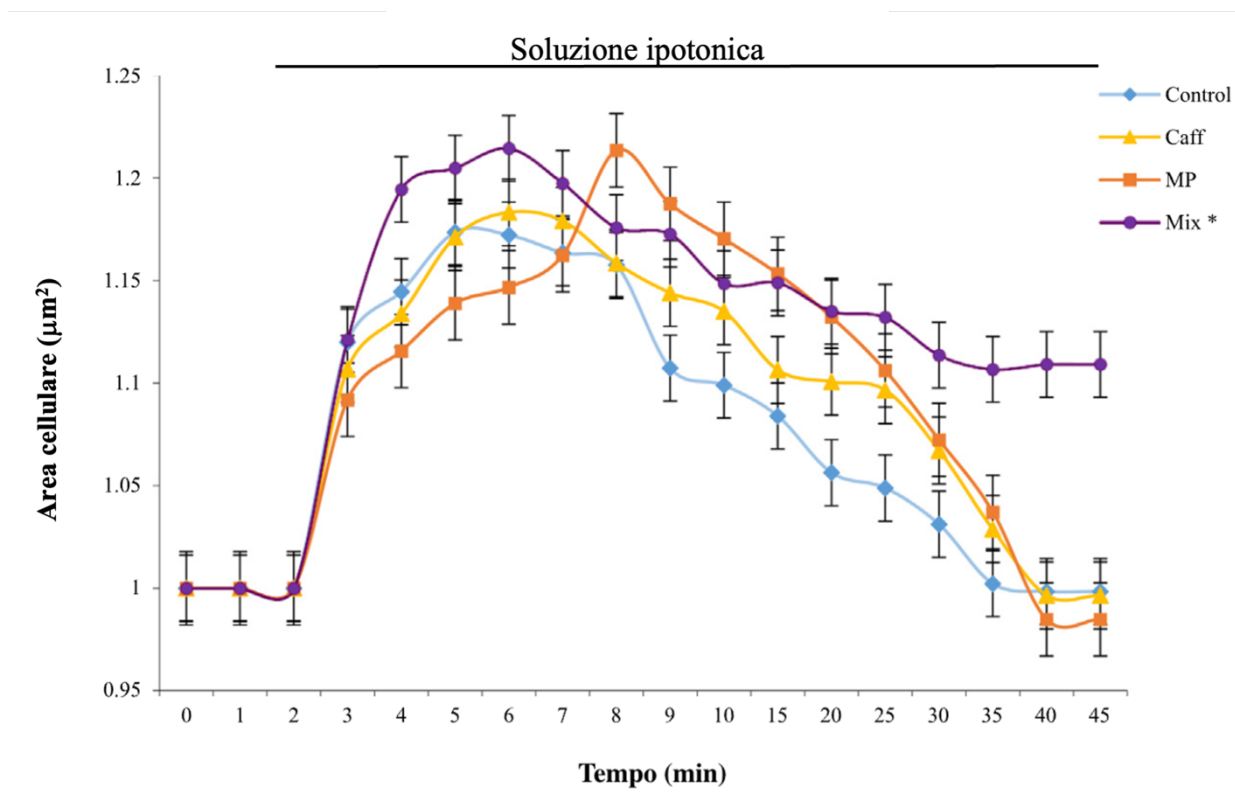


Figura 43: Regolazione del volume cellulare (RVD) delle cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* dopo 14 giorni di esposizione agli inquinanti. I rombi (◆) rappresentano il controllo (0 mg/L); i triangoli (▲) il gruppo Caff (20,0 µg/L di caffeina); i quadrati (■) il gruppo MP (1,0 mg/L di microplastiche); i cerchi (●) il gruppo Mix (20,0 µg/L di caffeina + 1,0 mg/L di microplastiche). I valori sono espressi come media ± errore standard (n = 4). Le differenze statisticamente significative del gruppo Mix rispetto al controllo ($p < 0,05$) sono indicate con * (ANOVA a due vie).

La valutazione dell'attività antiossidante ha evidenziato regolarità simili per tutti gli enzimi studiati nei gruppi esposti (Figura 44A, B, C, D). Si è osservata una diminuzione dell'attività enzimatica sotto l'effetto delle MP (Mn-SOD, catalasi, GST) e della miscela Mix (Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, catalasi). Nessuna delle esposizioni ha indotto un'attivazione degli enzimi antiossidanti. Analogamente, la generazione di prodotti di perossidazione lipidica (TBARS) e di ossidazione proteica (carbonili proteici) non è risultata incrementata nelle esposizioni applicate (Figura 44E, F). I loro livelli sono

stati addirittura ridotti dalle MP (TBARS). L'esposizione a caffeina non ha influenzato alcuno dei marcatori di stress ossidativo studiati.

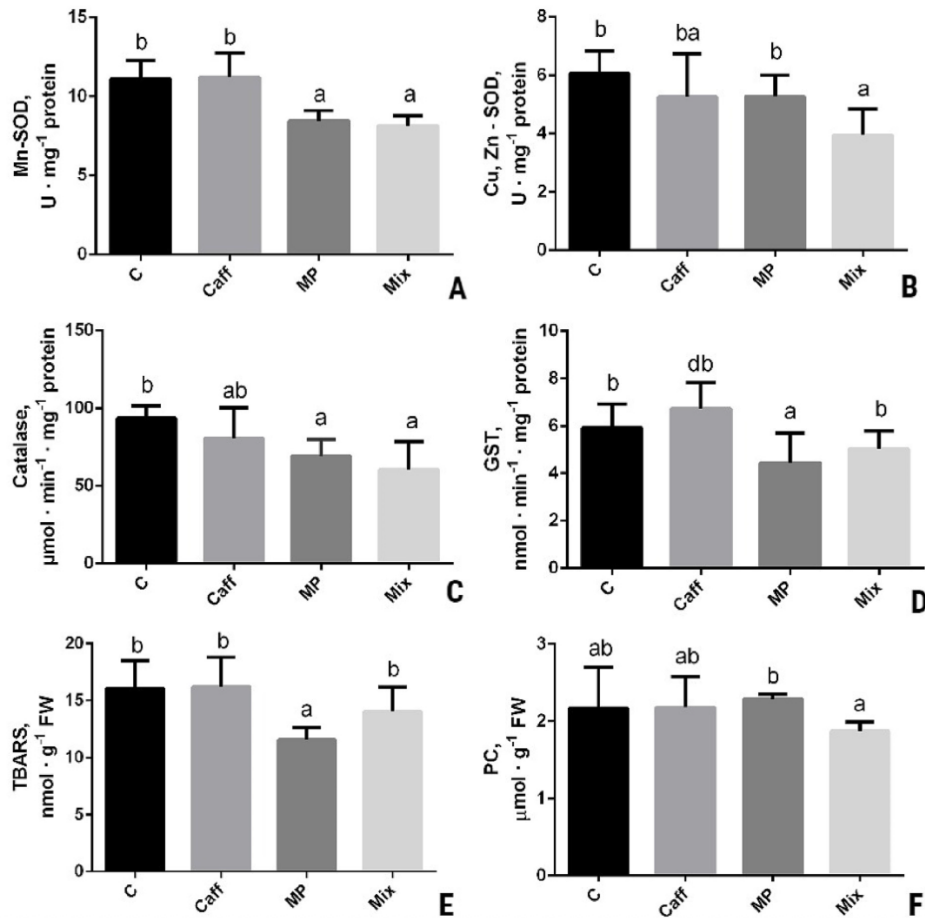


Figura 44: Attività degli enzimi antiossidanti e lesioni ossidative nella ghiandola digestiva del mollusco bivalve *M. galloprovincialis* esposto a caffeina (Caff), microplastiche (MP) e alla loro miscela (Mix) per 14 giorni, $M \pm DS$, $N = 6$. A, Mn-SOD; B, Cu,Zn-SOD; C, Catalasi; D, GST; E, TBARS; F, Carbonili proteici. Lettere diverse sopra le colonne indicano differenze significative tra i gruppi, $P < 0,05$. I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS Statistics per Windows, Versione 24.

L'esposizione a caffeina non ha influenzato i livelli di GSH e GSSG, mentre le MP hanno incrementato la concentrazione di GSH, e sia le MP che la miscela Mix hanno ridotto la concentrazione di GSSG nella ghiandola digestiva dei molluschi (Figura 45A,B). Conseguentemente, l'indice redox del glutatione (RI GSH) non è risultato modificato

rispetto al controllo nel gruppo caffeina, ma è aumentato rispettivamente di 1,5 e 1,4 volte nei gruppi MP e Mix (Figura 45C).

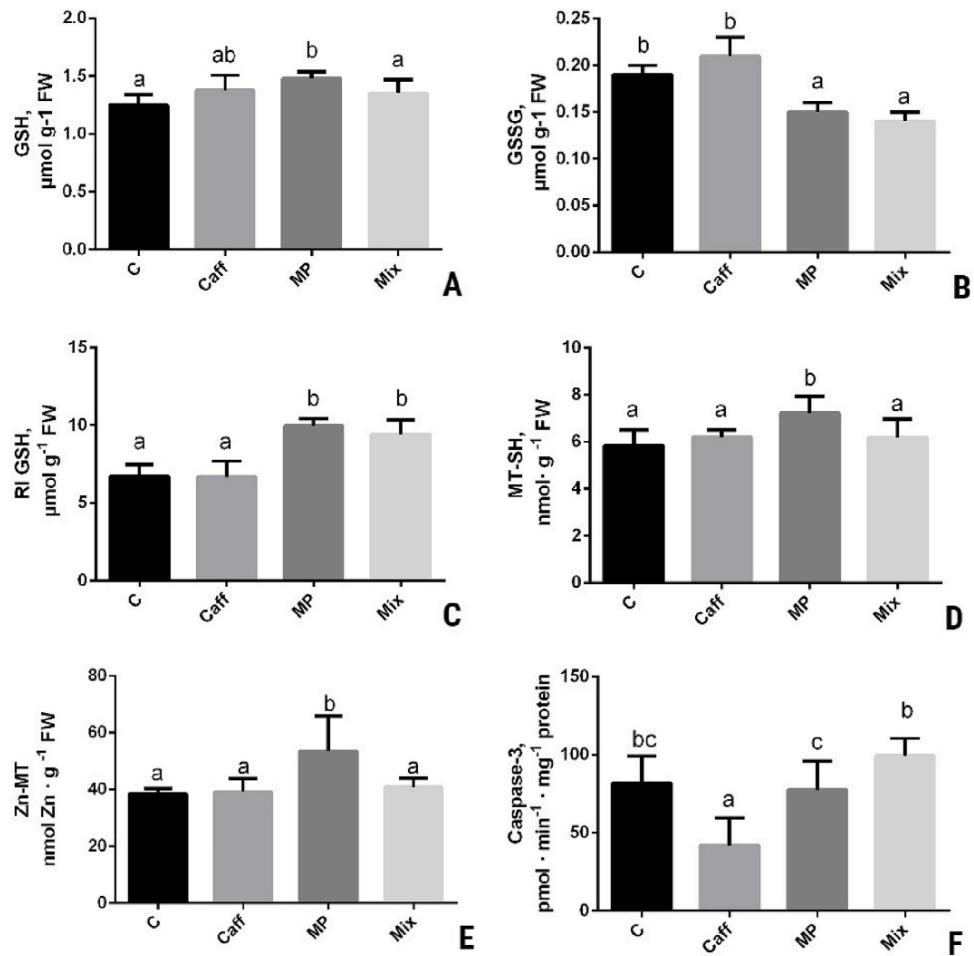


Figura 45: Concentrazioni di GSH (A), GSSG (B), proteina metallotioneina (MT-SH), Zn nelle metallotioneine (Zn_{MT}), e attività della caspasi-3 nella ghiandola digestiva del mollusco bivalve *M. galloprovincialis* esposto a caffeina (Caf), microplastiche (MP) e alla loro miscela (Mix) per 14 giorni, $M \pm DS$, $N = 6$. Lettere diverse sopra le colonne indicano differenze significative tra i gruppi, $P < 0,05$. I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS Statistics per Windows, Versione 24.

L'analisi della concentrazione di metallotioneine ha mostrato una correlazione simultanea tra la proteina MT totale, rilevata dai tioli, e il livello di zinco eluito con le MT mediante cromatografia ad esclusione molecolare (Zn-

MT). È stato osservato che solo l'esposizione alle MP ha causato l'incremento di entrambi i parametri delle MT (Figura 45D, E). Tutte le altre esposizioni non li hanno influenzati. L'effetto più evidente e particolare è stato mostrato dalla caspasi-3, la cui attività è diminuita di 2 volte in seguito all'esposizione alla caffeina e non è cambiata rispetto al controllo nelle altre esposizioni (Figura 45F).

A livello tissutale, sono state osservate alterazioni strutturali significative nelle branchie. I filamenti dei campioni esposti a caffeina apparivano ostruiti da emociti (Figura 46). Nei campioni esposti a MP si è osservata una rarefazione della densità delle ciglia (Figura 47) e le pareti dei filamenti mostravano irregolarità rispetto al controllo (Figura 48). I campioni esposti alle MP presentavano filamenti rotti con bastoncelli chitinosi staccati dall'epitelio e spazi intra e inter-filamentari irregolari.

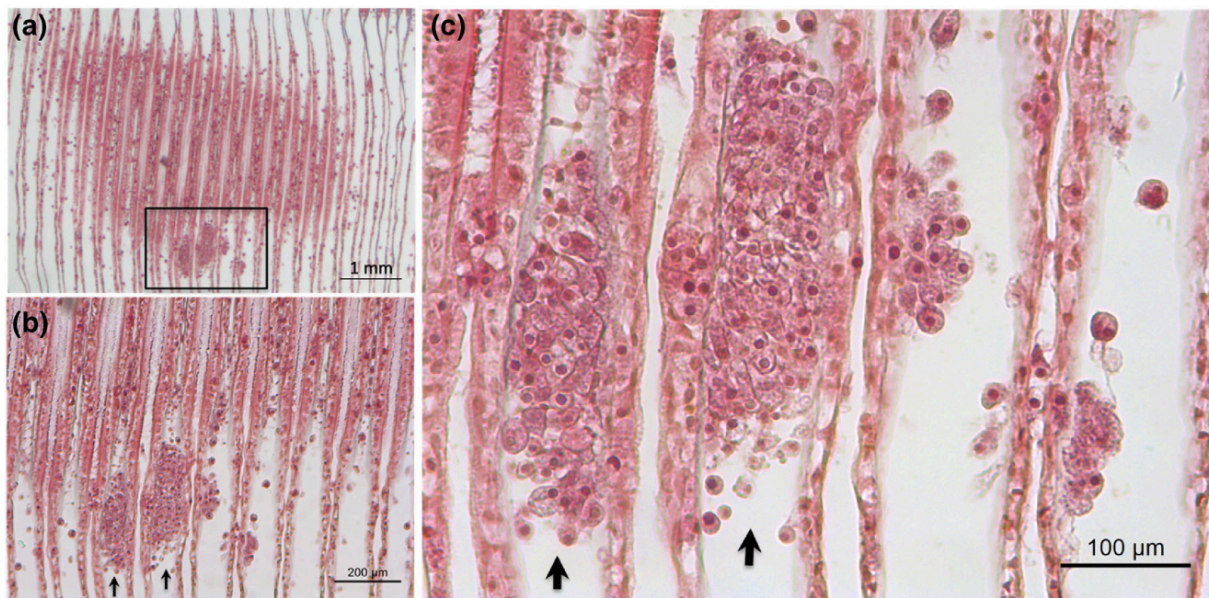


Figura 46: Micrografie in microscopia ottica della branchia di *M. galloprovincialis* esposto a caffeina. (a–c) accumulo di emociti che ostruiscono i filamenti (frecche nere). Tricromica di Masson con Blu di Anilina. Ingrandimento 2,5× (a), 10× (b), 20× (c).

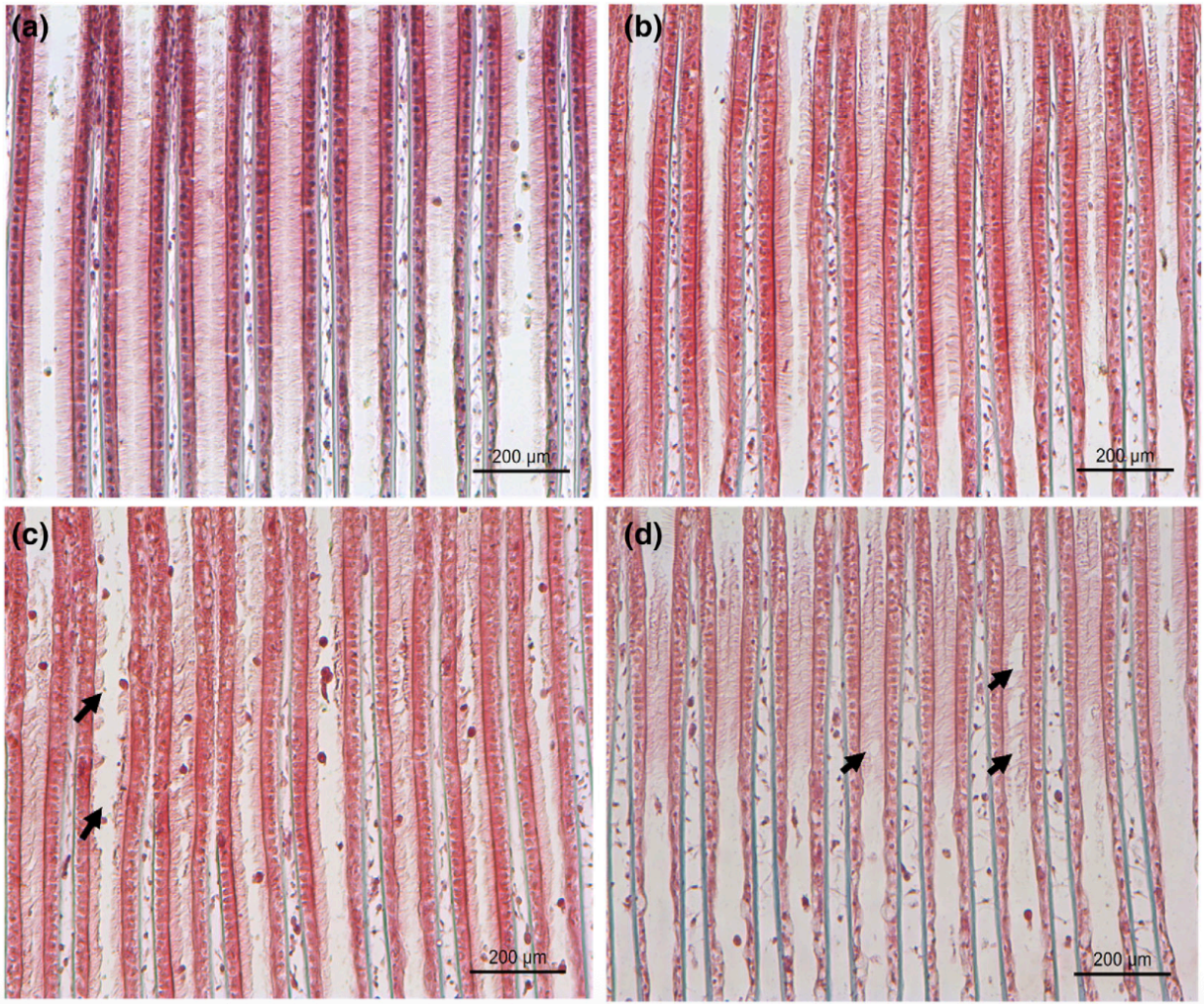


Figura 47: Micrografie in microscopia ottica della sezione sagittale dei filamenti branchiali di *M. galloprovincialis*. (a) campione controllo, (b) campione esposto a caffeina, (c) campione esposto a microplastiche, (d) campione esposto a caffeina e microplastiche. (c, d) rarefazione della densità delle ciglia (freccie nere). Tricromica di Masson con Blu di Anilina. Ingrandimento 10× (a–d).

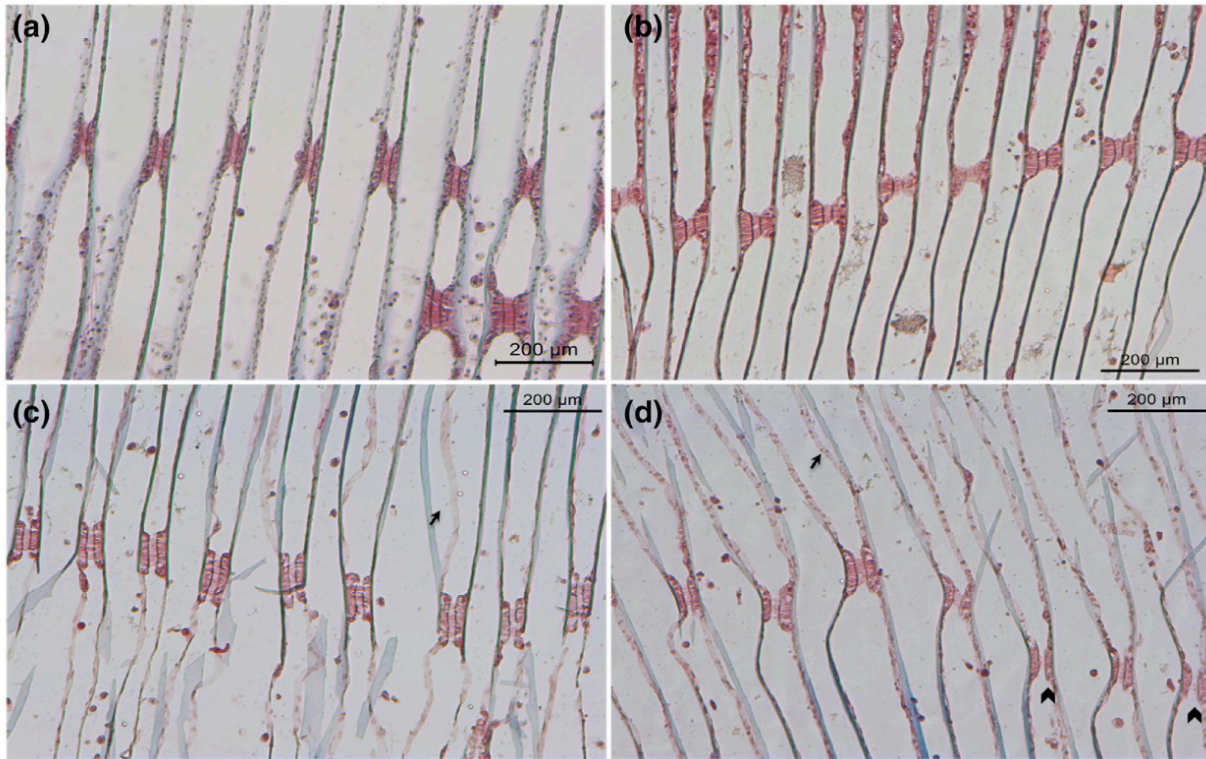


Figura 48: Micrografie in microscopia ottica della sezione longitudinale delle branchie di *M. galloprovincialis*. (a) campione controllo; (b) campione esposto a caffeina, (c) campione esposto a MP, (d) campione esposto a caffeina e MP. (b–d) Pareti dei filamenti irregolari. (c, d) Filamenti rotti, distacco dell'epitelio dal bastoncino chitinoso (freccia), dischi ciliari senza ciglia (gallone). Tricromica di Masson con Blu di Anilina. Ingrandimento 10× (a–d).

L'organizzazione dei dischi ciliari risultava danneggiata in tutti i gruppi sperimentali, con cellule che mostravano degenerazione idropica (rigonfiamenti AB-PAS negativi) nei campioni esposti a MP (Figura 49a). Nei campioni esposti a MP si verificava inoltre proliferazione cellulare con fusione parziale dei filamenti branchiali (Figura 49b,c) e una riduzione della densità delle ciglia laterali (Figura 50). In tutti i gruppi sperimentali si osservava un allargamento della zona abfrontale dovuto all'infiltrazione di emociti.

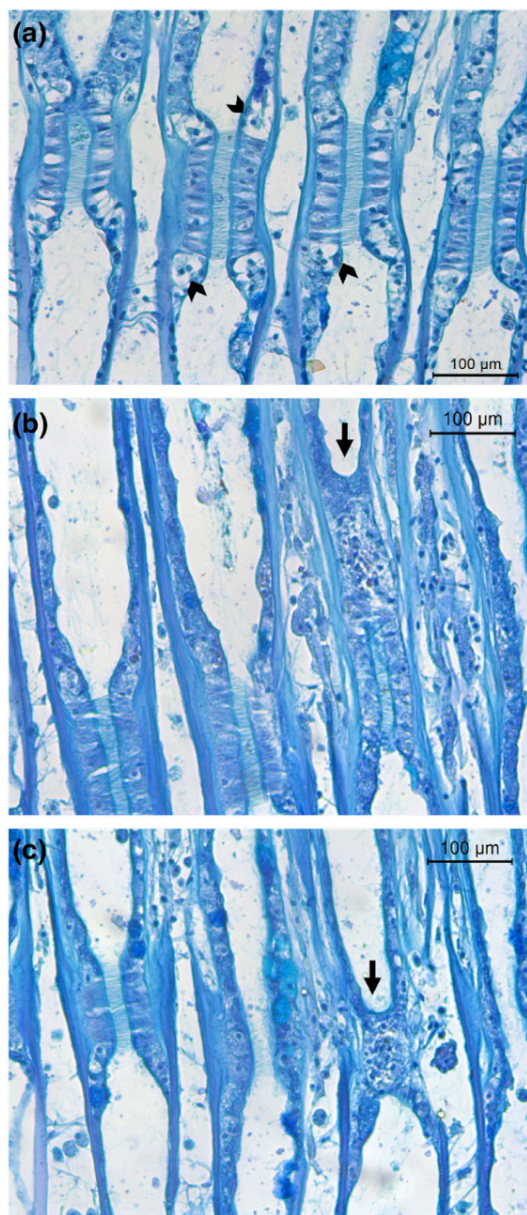


Figura 49: Micrografie in microscopia ottica di una sezione longitudinale di una lamella. (a) campioni esposti a caffeina e MP: rigonfiamenti cellulari AB-PAS negativi vicino ai dischi ciliari (gallone); (b, c) campione esposto a MP: proliferazione cellulare e fusione parziale dei filamenti branchiali (freccie). Colorazione AB-PAS. Ingrandimento 20× (a–c).

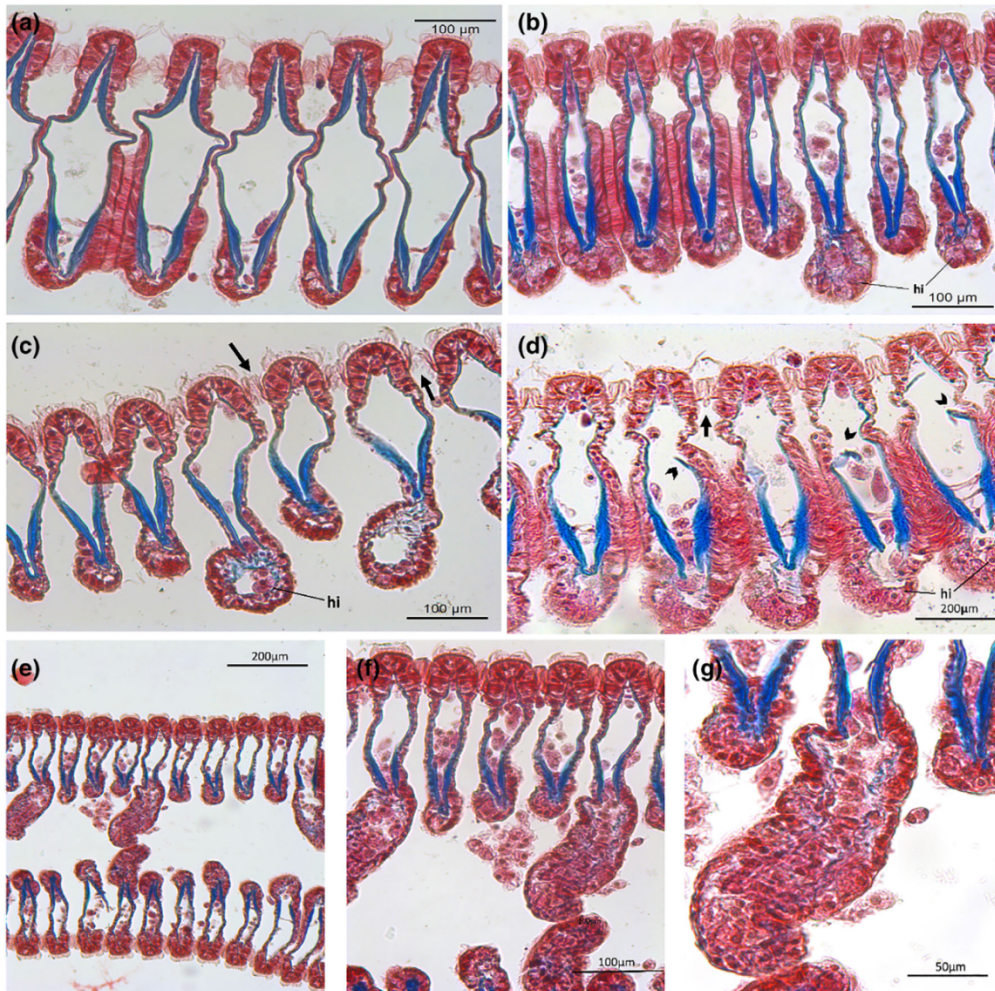


Figura 50: Micrografie in microscopia ottica di sezioni trasversali dei filamenti branchiali di tutti i gruppi sperimentali. (a) campione controllo, (b) campione esposto a caffeina, (c) campione esposto a microplastiche, (d) campione esposto a caffeina e microplastiche. (b–d) Infiltrazione di emociti (hi) nella zona abfrontale del filamento, ciglia laterali (freccie nere), bastoncini chitinosi rotti (freccia gallone); (e–g) campioni esposti a caffeina con infiltrazione di emociti. Tricromica di Masson con blu di anilina. Ingrandimento 20× (a–f), 10× (e), 40× (g). I cambiamenti nell'area relativa, misurati con il software Image J, mostrano una diminuzione delle dimensioni cellulari dopo il rigonfiamento iniziale in soluzione ipotonica (1 min) e dopo 40 min. I dati sono mostrati come media ± ES (n = 6). L'asterisco è stato utilizzato per il confronto significativo con il gruppo controllo: *p < 0,05 (ANOVA ad una via seguita dal test post hoc di confronti multipli di Tukey).

5.7. Esposizione al DEHT

I dettagli metodologici e i risultati completi di questo studio sono consultabili nell'articolo: Porretti et al., 2023, *Chemosphere*, 336, 139273. Di seguito è riportata la prima pagina dell'articolo.

Chemosphere 336 (2023) 139273



Assessment of the effects of non-phthalate plasticizer DEHT on the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis*

Miriam Porretti^{a,1}, Federica Impellitteri^{b,1}, Alessia Caferro^c, Ambrogina Albergamo^d,
Federica Litrenta^d, Mariacristina Filice^c, Sandra Imbrogno^c, Giuseppa Di Bella^{d,*,**},
Caterina Faggio^{a,*}

^a University of Messina, Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, 98100, Messina, Italy

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

^c University of Calabria, Department of Biology, Ecology and Earth Sciences, Via P. Bucci, 87036, Arcavacata di Rende, Cosenza, Italy

^d University of Messina, Department of Biomedical, Dental, Morphological and Functional Images Sciences (BIOMORF), 98100, Messina, Italy

Il presente studio ha valutato gli effetti dell'esposizione al plastificante di(2-etilesilico) tereftalato (DEHT) su esemplari di *M. galloprovincialis* per 14 giorni, utilizzando le seguenti condizioni sperimentali: gruppo controllo (C), gruppo DEHT1 (1 mg/L) e gruppo DEHT100 (100 mg/L).

L'esposizione al DEHT ha prodotto effetti differenziali sulla vitalità cellulare a seconda del tessuto analizzato. Gli emociti hanno dimostrato una notevole resistenza al trattamento, mantenendo un'elevata stabilità della membrana lisosomiale e vitalità superiore al 93% in entrambe le concentrazioni testate, senza differenze statisticamente significative rispetto al controllo ($\geq 95\%$). Le cellule della ghiandola digestiva hanno mostrato una risposta più sensibile al trattamento. Mentre l'esposizione a 1 mg/L ha

mantenuto valori di vitalità comparabili al controllo ($\geq 97\%$) nel test TB, il saggio NR ha evidenziato una riduzione significativa della vitalità nelle cellule DEHT1 rispetto al controllo (97.1% vs 98.5%, $p < 0.05$). È emersa inoltre una differenza significativa tra i due gruppi di esposizione DEHT1 e DEHT100 nel test NR (97.1% vs 97.9%, $p < 0.05$) (Tabella 12).

Tabella 12: Vitalità cellulare in *M. galloprovincialis* esposto a DEHT valutata mediante test TB e NR. I dati rappresentano la percentuale di cellule vitali (media \pm DS di dieci analisi in doppio).

Gruppo Sperimentale	Metodo	Controllo	DEHT1 (1 mg/L)	DEHT100 (100 mg/L)
Emociti	TB	95,4 \pm 2,1	93,6 \pm 4,9	93,6 \pm 4,9
	NR	96,9 \pm 1,6	97,0 \pm 2,9	96,9 \pm 2,9
Cellule della ghiandola digestiva	TB	97,2 \pm 0,5	98,0 \pm 0,3	97,5 \pm 0,4
	NR	98,5 \pm 1,5	97,1 \pm 1,8*	97,9 \pm 1,4 ^a

* indica una differenza significativa rispetto al controllo ($p < 0.05$); ^a indica una differenza significativa rispetto a DEHT1 ($p < 0.05$).

L'analisi della capacità regolatoria del volume ha rivelato alterazioni funzionali significative. In condizioni fisiologiche, le cellule della ghiandola digestiva dimostrano capacità omeostatiche attraverso il rigonfiamento reversibile in ambiente ipotonico. Il gruppo controllo ha mostrato un incremento graduale del volume cellulare che ha raggiunto il massimo dopo 10 minuti, seguito da un ritorno verso i valori basali. I gruppi esposti hanno evidenziato compromissioni dose-dipendenti di questa funzione regolatoria. Le cellule DEHT1 hanno presentato un rigonfiamento ridotto e incompleto recupero, con un volume finale superiore a quello iniziale. Le cellule DEHT100 hanno mostrato una risposta ancora più alterata, con un volume finale inferiore anche rispetto al controllo. L'analisi statistica ha confermato una significativa riduzione della capacità

regolatoria in entrambi i gruppi esposti ($p < 0.05$), con compromissione progressiva correlata all'aumento della concentrazione (Figura 51).

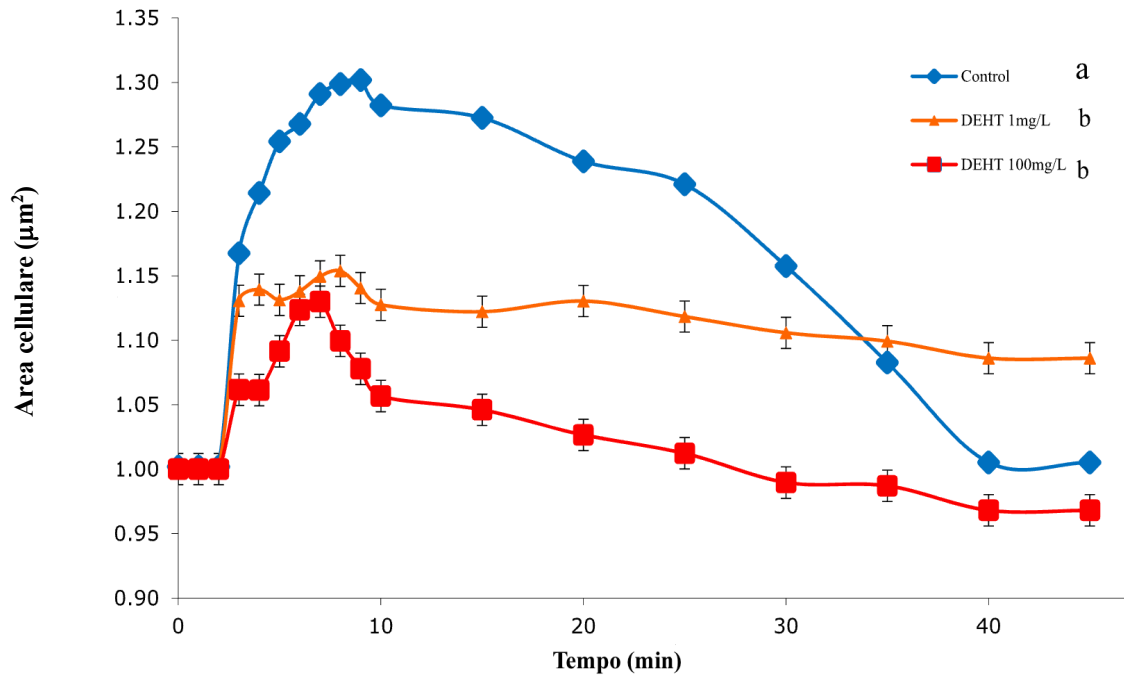


Figura 51: Effetti dell'esposizione a DEHT1 e DEHT100 sulla diminuzione del volume regolatorio delle cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis*. I dati sono espressi come area cellulare media \pm DS di misurazioni in triplicato. a-b: lettere diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$ con test post hoc HSD di Tukey); lettere uguali nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0,05$ con test post hoc HSD di Tukey).

La valutazione dei marcatori di stress ossidativo ha mostrato modificazioni moderate ma non significative. L'attività della SOD ha presentato un trend di incremento concentrazione-dipendente in entrambi i tessuti analizzati, senza raggiungere la significatività statistica ($p > 0.05$). Nelle branchie, i valori sono aumentati da 31.27 U/mg prot (controllo) a 33.67 U/mg prot (DEHT1) e 38.61 U/mg prot (DEHT100). Nella ghiandola digestiva, l'incremento è stato più contenuto, passando da 14.05 U/mg prot (controllo) a 16.71 U/mg prot (DEHT1) e 16.05 U/mg prot (DEHT100). I livelli di

perossidazione lipidica (TBARS) e di ossidazione proteica (derivati aldeidici e chetonici) non hanno mostrato variazioni significative tra i gruppi sperimentali, suggerendo che le concentrazioni testate non abbiano indotto un danno ossidativo evidente nei tempi di esposizione considerati (Figura 52 e Figura 53).

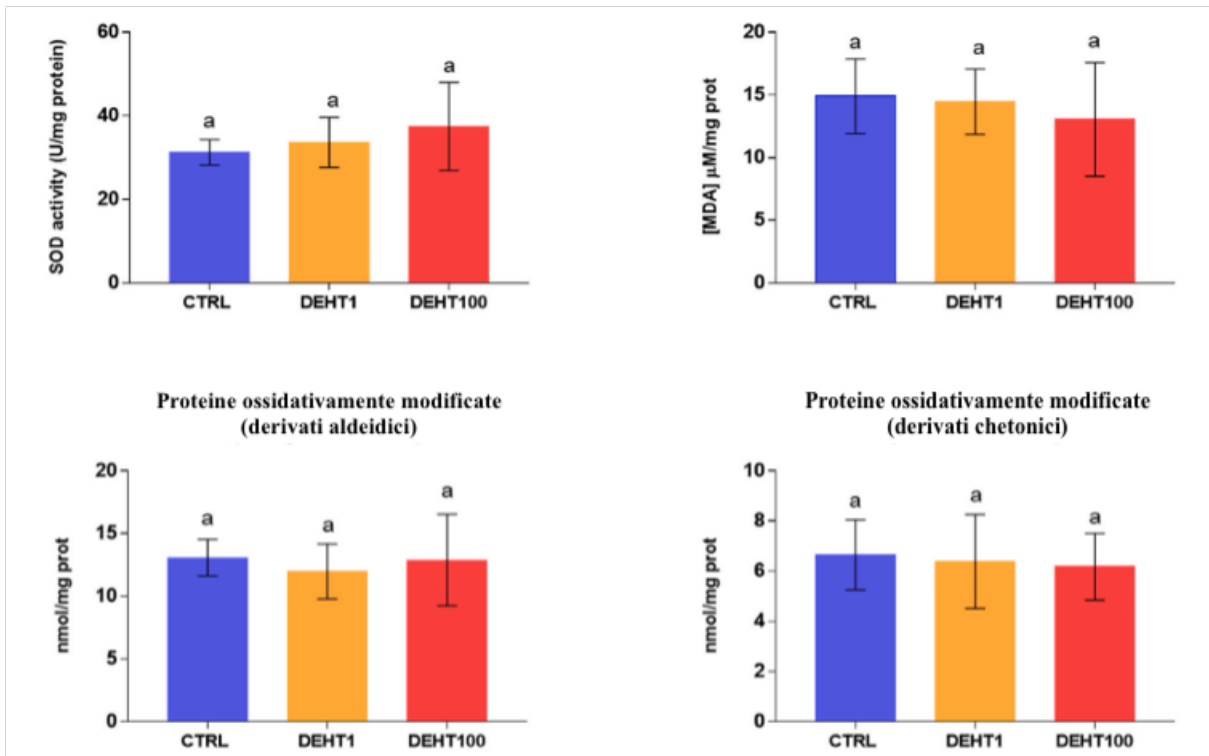


Figura 52: Effetti dell'esposizione a DEHT1 e DEHT100 sull'attività SOD, TBARS e OMP delle branchie di *M. galloprovincialis*. I dati sono espressi come media \pm S.E. a-b: lettere apicali diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0.05$ con il test post hoc Tukey); le stesse lettere apicali nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0.05$ con il test post hoc Tukey).

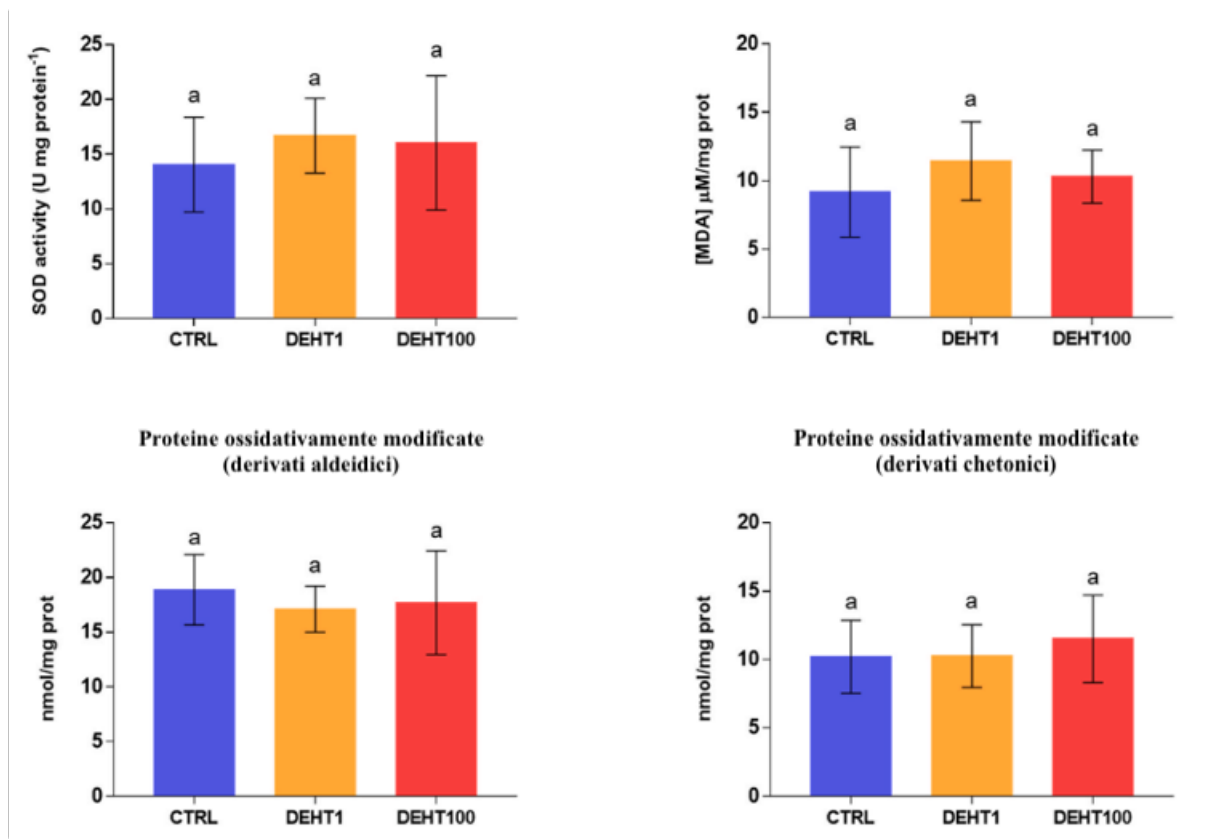


Figura 53: Effetti dell'esposizione a DEHT1 e DEHT100 sull'attività SOD, TBARS e OMP nella DG di *M. galloprovincialis*. I dati sono espressi come media \pm S.E. a-b: lettere apicali diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0.05$ con il test post hoc Tukey); le stesse lettere apicali nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0.05$ con il test post hoc Tukey).

5.8. Esposizione alla Clorpromazina

I dettagli metodologici e i risultati completi di questi studi sono consultabili negli articoli: Impellitteri et al., 2023a, *Frontiers in Physiology*, 14, 1267953; Impellitteri et al., 2024b, *Chemosphere*, 350, 141079. Di seguito è riportata la prima pagina degli articoli in questione.



OPEN ACCESS

EDITED BY
 Yiming Li,
 Fishery Machinery and Instrument
 Research Institute, China

REVIEWED BY
 Daniel Carneiro Moreira,
 University of Brasilia, Brazil
 Paula Mariela González,
 University of Buenos Aires, Argentina

*CORRESPONDENCE
 Caterina Faggio,
 ✉ cfaggio@unime.it

RECEIVED 27 July 2023
 ACCEPTED 31 August 2023
 PUBLISHED 13 September 2023

CITATION
 Impellitteri F, Yunko K, Martyniuk V,
 Khoma V, Piccione G, Stoliar O and
 Faggio C (2023), Cellular and oxidative
 stress responses of *Mytilus*
galloprovincialis to chlorpromazine:
 implications of an antipsychotic drug
 exposure study.
Front. Physiol. 14:1267953.
 doi: 10.3389/fphys.2023.1267953

Cellular and oxidative stress responses of *Mytilus galloprovincialis* to chlorpromazine: implications of an antipsychotic drug exposure study

Federica Impellitteri ¹, Kateryna Yunko ²,
 Viktoria Martyniuk ², Vira Khoma ³, Giuseppe Piccione ¹,
 Oksana Stoliar ^{2,4} and Caterina Faggio ^{4*}

¹Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Messina, Italy, ²Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine, ³Ternopil Scientific Research Forensic Center of the Ministry of Internal Affairs of Ukraine, Ternopil, Ukraine, ⁴Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy

Chemosphere 350 (2024) 141079



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

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



Chlorpromazine's impact on *Mytilus galloprovincialis*: a multi-faceted investigation

Federica Impellitteri ^a, Katerina Yunko ^b, Giovanna Calabrese ^c, Miriam Porretti ^c,
 Viktoria Martyniuk ^b, Lesya Gnatyshyna ^d, Vincenzo Nava ^e, Angela Giorgia Potorti ^e,
 Giuseppe Piccione ^a, Giuseppa Di Bella ^e, Oksana Stoliar ^{b,c}, Caterina Faggio ^{c,f,*}

^a Dept. of Veterinary Sciences, University of Messina, Viale Giovanni Palatucci Snc, 98168, Messina, Italy

^b Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, M. Kryvonosa Str. 2, 46027, Ternopil, Ukraine

^c Dept. of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres 31, 98166, Messina, Italy

^d I.Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Maidan Voli 1, 46001, Ternopil, Ukraine

^e University of Messina, Department of Biomedical, Dental, Morphological and Functional Images Sciences (BIOMORF), 98100, Messina, Italy

^f Department of Ecosustainable Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Naples, Italy

I presenti studi hanno valutato gli effetti dell'esposizione alla clorpromazina (Cpz) su esemplari di *M. galloprovincialis* per 14 giorni, utilizzando le seguenti condizioni sperimentali: gruppo controllo (C: 0 mg/L), gruppo Cpz1 (12 ng/L) e gruppo Cpz2 (12 µg/L).

Dopo 14 giorni di esposizione, la vitalità delle cellule della ghiandola digestiva è rimasta elevata in tutte le condizioni testate, con percentuali di cellule vitali superiori al 90%. Tuttavia, sono state osservate differenze significative tra i gruppi. Il gruppo esposto alla concentrazione più elevata (Cpz2) ha mostrato una vitalità significativamente ridotta ($p < 0.01$) rispetto sia al controllo che alla concentrazione inferiore (Cpz1; $p < 0.01$). Questa osservazione è risultata consistente in entrambi i test NR e TB. Gli emociti hanno invece dimostrato un'elevata stabilità della membrana lisosomiale in tutte le condizioni testate, mantenendo una vitalità superiore al 90%. Questo trend è risultato consistente tra tutti i gruppi ed è stato confermato anche dal metodo di esclusione del TB.

Tabella 13: Vitalità cellulare in *M. galloprovincialis* esposto a clorpromazina valutata mediante test TB e NR dopo 14 giorni di esposizione. I dati sono presentati come media \pm ES ($n = 12$).

Gruppo Sperimentale	Metodo	Controllo	Cpz1	Cpz2
		(0 mg/L)	(12 ng/L)	(12 µg/L)
Emociti	TB	98 \pm 0,5	98 \pm 0,4	97 \pm 0,6
	NR	98 \pm 0,2	98 \pm 0,3	96 \pm 0,8
Cellule della ghiandola digestiva	TB	99 \pm 1	98 \pm 0,6	95 \pm 2,2**aa
	NR	99 \pm 0,1	98 \pm 0,2	94 \pm 0,7**aa

** : differenza significativa rispetto al controllo ($p < 0.01$); aa: differenza significativa di Cpz2 rispetto a Cpz1 ($p < 0.01$).

Per quanto concerne il test di regolazione del volume cellulare, l'analisi statistica non ha rivelato differenze statisticamente significative nei risultati degli esperimenti di esposizione a Cpz rispetto al gruppo controllo. Tuttavia, sono state osservate variazioni

sottili tra i gruppi testati e quello di controllo. Nel gruppo Cpz1 è stata osservata una tendenza per cui le cellule della ghiandola digestiva sembravano avere difficoltà nel ritornare al loro volume iniziale, risultando in un rigonfiamento prolungato (Figura 54). Le cellule della ghiandola digestiva esposte alla più alta concentrazione di Cpz hanno mostrato pattern di contrazione inusuali.

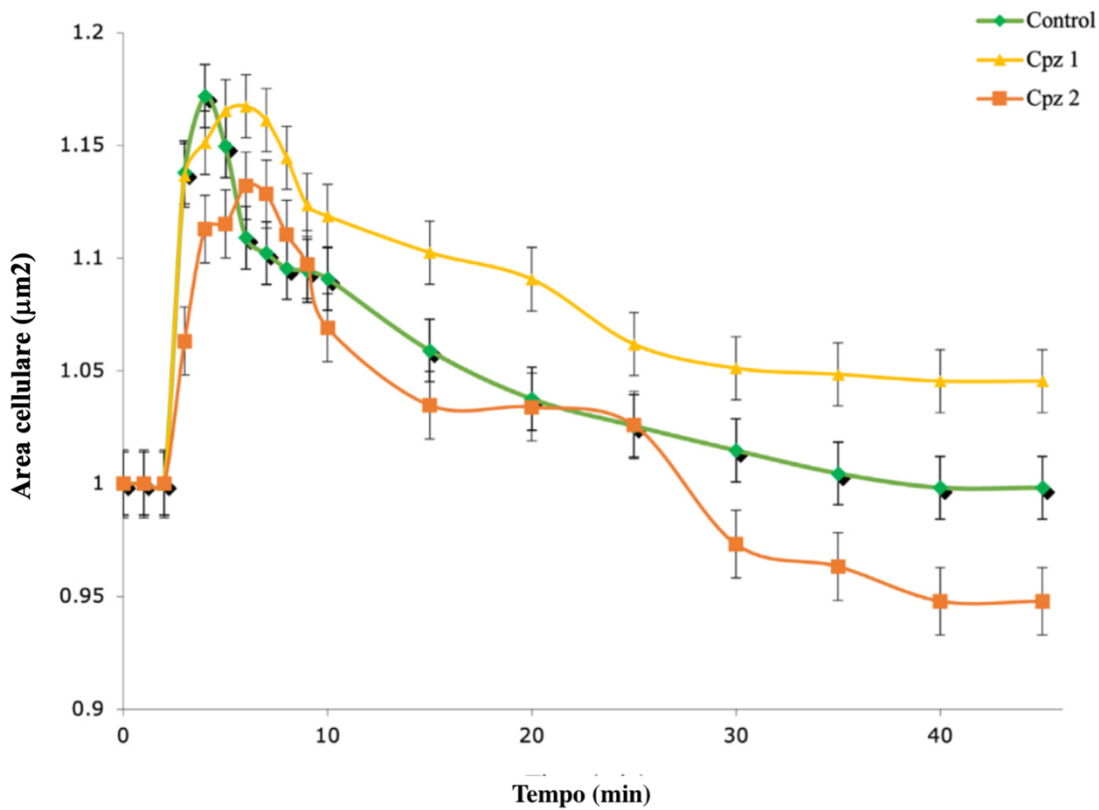


Figura 54: Regolazione della diminuzione del volume (RVD) delle cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* dopo 14 giorni di esposizione a clorpromazina (Cpz). I rombi (◆) rappresentano il controllo (0 mg/L); i triangoli (▲) rappresentano il gruppo Cpz1 (12 ng/L di Cpz); i quadrati (■) rappresentano il gruppo Cpz2 (12 µg/L di Cpz). I dati sono presentati come media ± ES (n = 12).

L'esposizione alla clorpromazina ha determinato alterazioni significative nel numero e nella morfologia del bisso (Figura 55). Il numero di placche dopo 14 giorni di esposizione

ha mostrato una riduzione significativa in entrambi i gruppi esposti (Tabella 14). Il gruppo sottoposto alla concentrazione ambientale ha evidenziato una maggiore compromissione ($39,5 \pm 4,95$) rispetto al gruppo esposto alla concentrazione più elevata ($49,5 \pm 6,36$). L'analisi statistica ha confermato significatività per entrambi i gruppi di esposizione rispetto al controllo ($p < 0,05$). Contrariamente alla riduzione numerica, la lunghezza delle placche di bisso ha mostrato un incremento correlato alla concentrazione di clorpromazina. Rispetto al gruppo controllo ($0,74 \pm 0,36$ mm), i campioni esposti a 12 ng/L hanno presentato un aumento della lunghezza ($0,84 \pm 0,33$ mm), seppur non significativo. I mitili esposti a 12 $\mu\text{g/L}$ hanno mostrato una lunghezza delle placche considerevolmente maggiore ($1,43 \pm 0,46$ mm), con differenza significativa rispetto al gruppo controllo.

Tabella 14: Parametri morfologici del bisso in *M. galloprovincialis* nei gruppi controllo e di trattamento dopo 14 giorni di esposizione. I dati sono presentati come media \pm DS di analisi in doppio.

Parametro	CTR	Cpz1 (12 ng/L)	Cpz2 (12 $\mu\text{g/L}$)
Numero di placche bissali	105 ± 0^a	$39,5 \pm 4,95^b$	$49,5 \pm 6,36^b$
Lunghezza delle placche bissali (mm)	$0,74 \pm 0,36^a$	$0,84 \pm 0,33^{a'c}$	$1,43 \pm 0,46^{b'c}$

a-c: lettere diverse indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$, test post hoc HSD di Tukey).

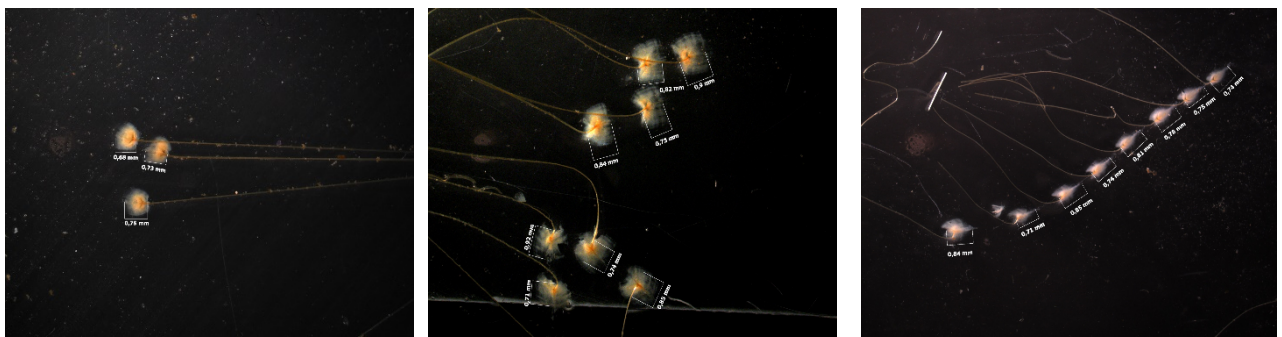


Figura 55: Immagini rappresentative di bisso ottenute con stereomicroscopio. Mostrano i cambiamenti nella lunghezza delle placche dal gruppo controllo (a) ai gruppi di esposizione Cpz1 (b) e Cpz2 (c) dopo 14 giorni di esposizione.

La valutazione delle manifestazioni antiossidanti ha rilevato trend opposti per ciascun enzima studiato in entrambi i gruppi esposti (Figura 56A, B). L'attività della SOD è aumentata, mentre la catalasi, particolarmente nel gruppo Cpz2, è diminuita. Questo squilibrio nelle attività antiossidanti è stato accompagnato dall'elevazione dei livelli di TBARS e carbonili proteici (Figura 56C, D).

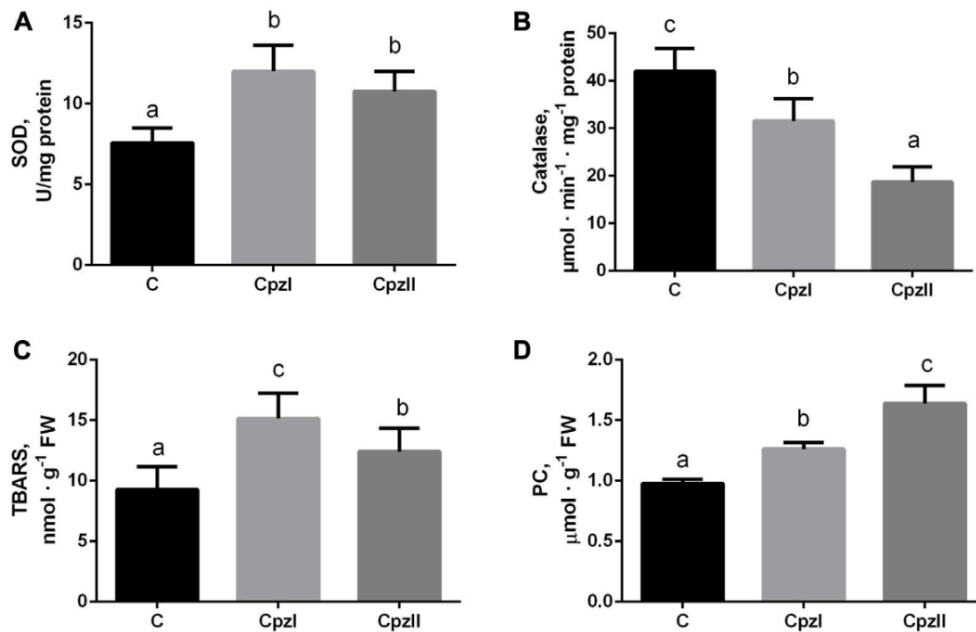


Figura 56: Attività degli enzimi antiossidanti e manifestazioni delle lesioni ossidative nella ghiandola digestiva del mollusco bivalve *M. galloprovincialis* in seguito all'esposizione a due concentrazioni di clorpromazina (Cpz) per 14 giorni: (A), superossido dismutasi; (B), catalasi; (C), TBARS; (D), carbonili proteici. Gruppi: C - gruppo controllo, Cpz1 - 12 ng/L di Cpz; Cpz2 - 12 µg/L di Cpz. Lettere diverse sopra le colonne indicano differenze significative tra i gruppi, $M \pm DS$, $N = 8$, $p < 0,05$. I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS Statistics per Windows, Versione 24.

La concentrazione di GSH è aumentata in modo simile in entrambe le esposizioni a Cpz, mentre il livello di GSSG è aumentato solo per la bassa concentrazione di Cpz, e di conseguenza l'indice redox GSH (RI GSH) è aumentato rispetto al controllo solo sotto l'effetto di Cpz1 (Figura 57A–C). Il valore medio delle manifestazioni antiossidanti/pro-

ossidanti (APB) nel gruppo controllo è stato considerato come 1.0. I calcoli del suo spostamento nelle esposizioni hanno indicato che in entrambi i gruppi esposti, nonostante gli indici individuali abbiano avuto deviazioni concentrazione-dipendenti diverse (Figura 57D), l'APB è diminuito rispetto al controllo quasi equamente (del 52.8% e 50.8% rispettivamente nei gruppi Cpz1 e Cpz2).

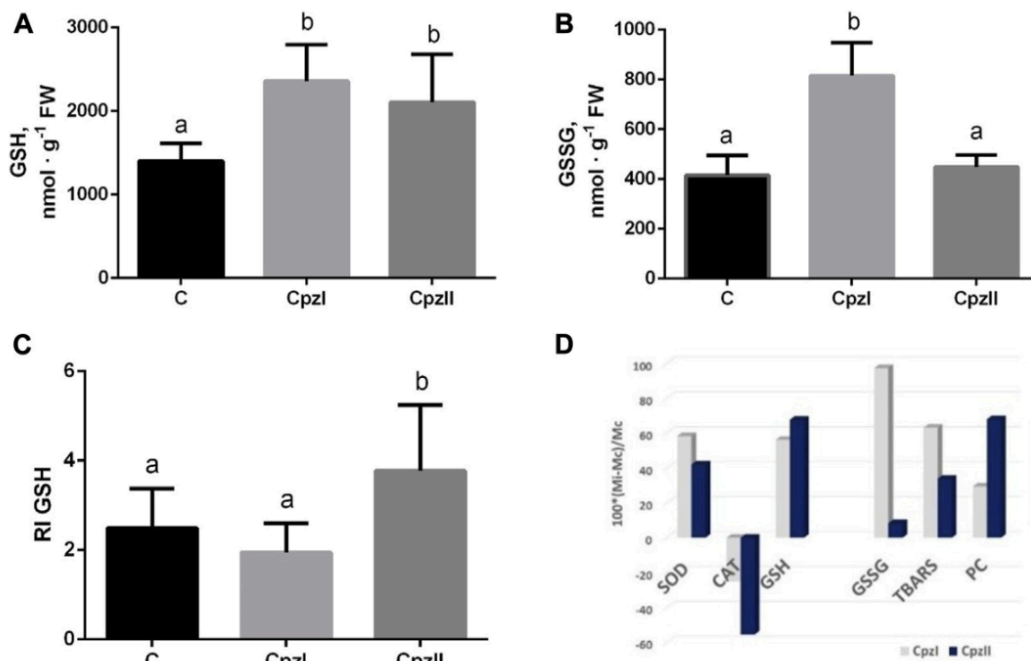


Figura 57: Concentrazioni di GSH (A), GSSG (B), indice redox del glutatione (C) e cambiamenti relativi di ciascun indice di stress ossidativo analizzato (D) nella ghiandola digestiva del mollusco bivalve *M. galloprovincialis* in seguito all'esposizione a due concentrazioni di clorpromazina (Cpz) per 14 giorni. Gruppi: C - gruppo controllo, Cpz1 - 12 ng/L di Cpz; Cpz2 - 12 µg/L di Cpz. Lettere diverse sopra le colonne indicano differenze significative tra i gruppi, $M \pm DS$, $N = 8$, $p < 0,05$. I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS Statistics per Windows, Versione 24.

L'analisi dei marcatori di danno cellulare ha rivelato alterazioni significative nella funzionalità cellulare. L'attività della caspasi-3 citosolica non ha mostrato variazioni nell'esposizione alla concentrazione più bassa, mentre nel gruppo Cpz2 si è registrato un incremento del 27% (Figura 58A). L'attività totale della catepsina D è aumentata di circa

l'80% in entrambe le esposizioni (Figura 58B), mentre il suo efflusso dai lisosomi è aumentato del 62% in entrambi i gruppi esposti (Figura 58C). L'attività della catepsina D lisosomiale ha mostrato incrementi del 90% e del 74% rispettivamente nei gruppi Cpz1 e Cpz2 rispetto al controllo. La stabilità della membrana lisosomiale ha subito una diminuzione drastica (del 97% e 152%) secondo il test NRR (Figura 58D).

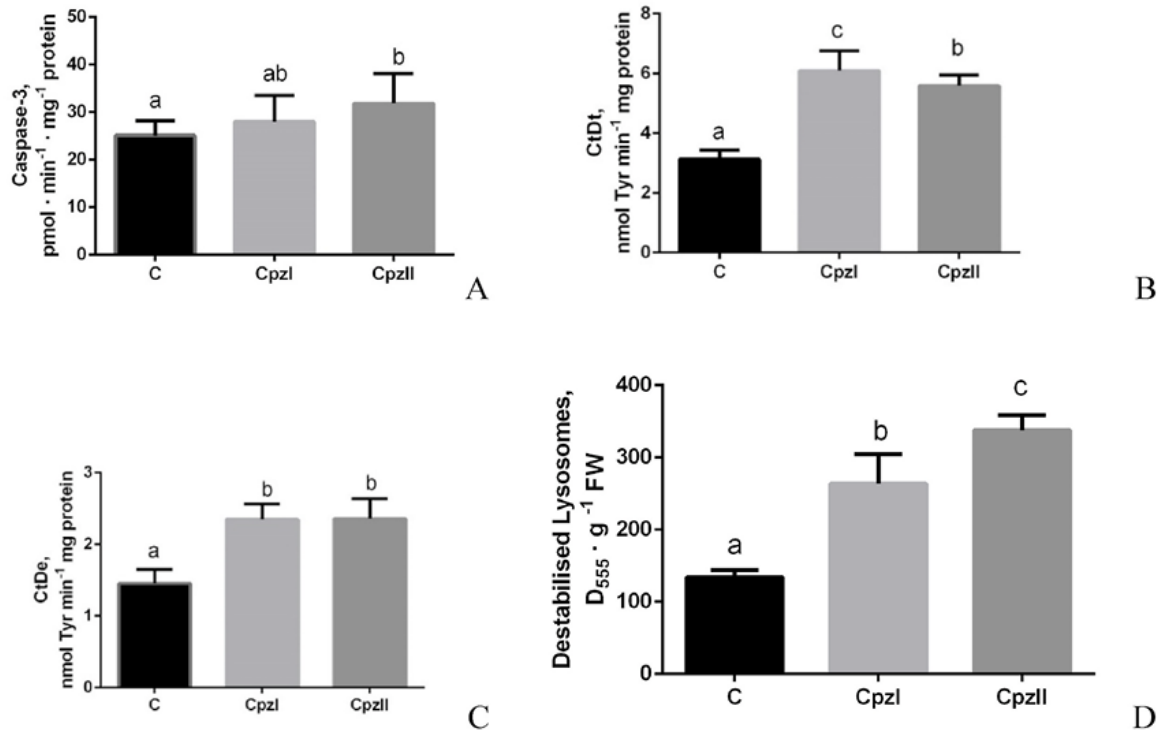


Figura 58: Attività della caspasi-3 (A), della catepsina D totale (B), della catepsina D extralisosomica (C) e destabilizzazione dei lisosomi indicata dal test NRR (D) nella ghiandola digestiva del mollusco bivalve *M. galloprovincialis* dopo l'esposizione a due concentrazioni di clorpromazina per 14 giorni. Gruppi: C (gruppo controllo), Cpz1 (12 ng/L di Cpz); Cpz2 (12 µg/L di Cpz). Lettere diverse sopra le colonne indicano differenze significative tra i gruppi, Media ± DS, N = 8, p < 0,05. I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS Statistics per Windows, Versione 24.

L'analisi istologica ha fornito evidenze dirette del danno tissutale indotto dall'esposizione alla clorpromazina, rivelando compromissioni strutturali significative a livello della ghiandola digestiva. La colorazione H&E è stata eseguita per valutare le alterazioni morfologiche della ghiandola digestiva dopo 14 giorni di esposizione alla clorpromazina. I risultati hanno mostrato che la ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* esposta a Cpz presenta alterazioni strutturali significative all'interno delle unità alveolo-tubulari (Figura 59). La struttura normale dei tubuli digestivi è caratterizzata da un singolo strato di cellule epiteliali ciliate completamente arrotondate che delimitano un lume ristretto (Figura 59A). L'esposizione alla Cpz ha danneggiato visibilmente questa architettura tubulare, con gravi lesioni osservate in entrambi i gruppi trattati (Cpz1 e Cpz2), sebbene risultino più pronunciate nel gruppo Cpz1. Nel gruppo Cpz1, i tubuli digestivi sono risultati degradati, con cellule epiteliali atrofiche e perdita dell'assetto cellulare normale. Questa compromissione ha comportato un allargamento anomalo del lume tubulare e un assottigliamento della membrana basale delle cellule epiteliali, portando alla formazione di tubuli atrofici (Figura 59B-E). Similmente, nelle ghiandole digestive del gruppo Cpz2 sono state osservate lesioni locali, tubuli atrofici e fibrosi cellulare, condizione che potrebbe rappresentare un precursore della necrosi (Figura 59C-F). In entrambi i gruppi trattati sono state documentate alterazioni associate a processi infiammatori, inclusa l'infiltrazione emocitaria, la presenza di granulociti e "cellule brune" contenenti accumuli di sostanze simili alla lipofuscina di colore giallo-marrone. Nel gruppo Cpz1, la proporzione di emociti nel tessuto intertubulare risultava maggiore (Figura 59E).

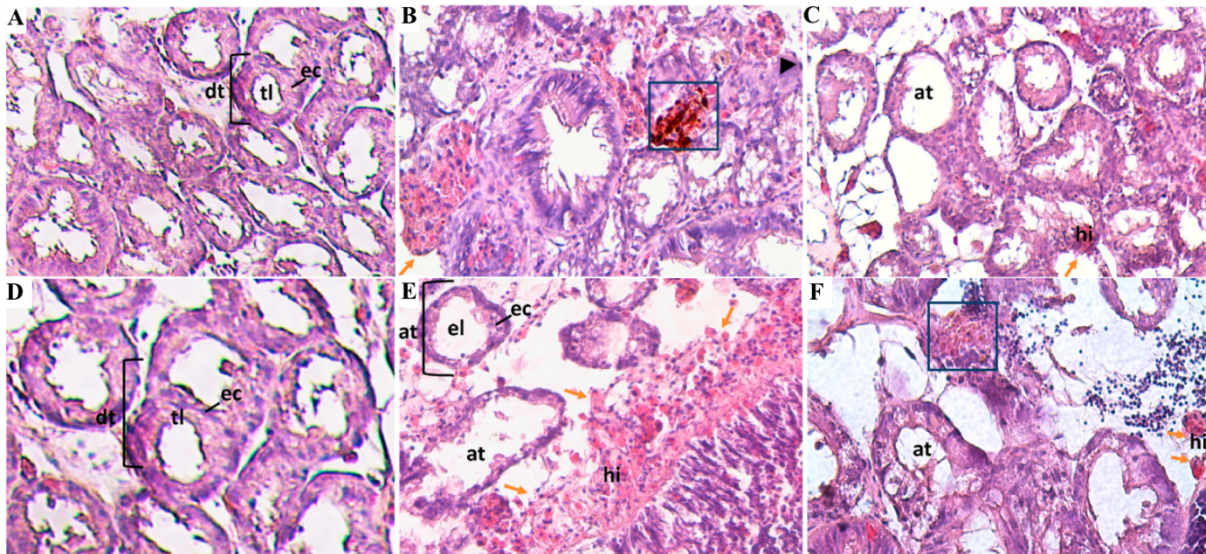


Figura 59: Immagini rappresentative della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis colorata* con H&E, che mostrano le alterazioni morfologiche del gruppo controllo (A, D), del gruppo Cpz1 (12 ng/L; B, E) e Cpz2 (12 µg/L; C, F) dopo 14 giorni di esposizione. (A, D) La configurazione tipica della ghiandola digestiva è caratterizzata da tubuli digestivi (dt) composti da un singolo strato di cellule digestive ed epiteliali (ec) che circondano un lume tubulare ristretto (tl). (B, E e C, F) Notevole atrofia dei tubuli digestivi (at), evidenziata da una riduzione dello spessore delle cellule epiteliali e da un allargamento del lume (el). La risposta infiammatoria è evidenziata dall'infiltrazione di emociti (hi, frecce arancioni) e da cellule brune associate a pigmenti simili alla lipofuscina (quadrato nero).









5.9. Efficacia protettiva di nutraceutici e bioprodotto: esposizioni combinate

5.9.1. SLS ed estratto di bergamotto

I dettagli metodologici e i risultati completi di questi studi sono consultabili negli articoli: Impellitteri et al., 2025c, *Antioxidants*, 14(5), 539; Multisanti et al., 2025a, *Environmental Pollution*, 371, 125939. Di seguito è riportata la prima pagina degli articoli in questione.

Article

Bergamot (*Citrus bergamia*): A Potential New Nutraceutical Against Cellular and Physiological Alterations Induced by Emerging Contaminants in Sentinel Organisms

Federica Impellitteri ^{1,†}, Cristiana Roberta Multisanti ^{1,†}, Kristian Riolo ², Giorgia Zicarelli ², Miriam Porretti ³, Giovanna Cafeo ⁴, Marina Russo ⁴, Paola Dugo ⁴, Giuseppa Di Bella ⁵, Giuseppe Piccione ¹, Alessia Giannetto ^{2,*} and Caterina Faggio ^{2,6,*}

- ¹ Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Viale Giovanni Palatucci SNC, 98168 Messina, Italy; federica.impellitteri@studenti.unime.it (F.I.); cristiana.multisanti@studenti.unime.it (C.R.M.); gpiccione@unime.it (G.P.)
 - ² Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres, 31, 98166 Messina, Italy; kristian.riolo@unime.it (K.R.); giorgyz@live.it (G.Z.)
 - ³ Auribondo APL Swift Services (Malta) Ltd., HF26, Hal Far Industrial Estate, BBG 3000 Birzebbugia, Malta; miriam.porretti@studenti.unime.it
 - ⁴ Messina Institute of Technology c/o Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Giovanni Palatucci SNC, 98168 Messina, Italy; giovanna.cafeo@studenti.unime.it (G.C.); marina.russo@unime.it (M.R.); paola.dugo@unime.it (P.D.)
 - ⁵ Dental, Morphological and Functional Images Sciences, Department of Biomedical, University of Messina, (BIOMORF), 98100 Messina, Italy; giuseppa.dibella@unime.it
 - ⁶ Department of Eco-Sustainable Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, 80100 Naples, Italy
- * Correspondence: agiannetto@unime.it (A.G.); cfaggio@unime.it (C.F.)
† These authors contributed equally to this work.

Environmental Pollution 371 (2025) 125939













Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

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

Bergamot (*Citrus bergamia*) as a potential anti-stress agent: Counteracting cellular and physiological changes by sodium lauryl sulphate in *Mytilus galloprovincialis*[☆]

Cristiana Roberta Multisanti ^{a,1}, Kristian Riolo ^{b,1}, Federica Impellitteri ^a, Giorgia Zicarelli ^b, Irene Vazzana ^c, Giovanna Cafeo ^d, Marina Russo ^d, Paola Dugo ^d, Caterina Faggio ^{b,e,*}, 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, Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres, 31, 98166, Messina, Italy

^c Zooprophytactic Institute of Sicily, Via Gino Marinuzzi, 90129, Palermo, Italy

^d Messina Institute of Technology c/o Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, Former Veterinary School, University of Messina, Viale G. Palatucci snc, 98168, Messina, Italy

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



Gli studi condotti hanno valutato il potenziale protettivo dell'estratto di bucce di bergamotto (BRG) contro gli effetti tossici del laurilsolfato di sodio (SLS) in esemplari di *M. galloprovincialis*. L'esperimento ha previsto l'esposizione per 14 giorni alle seguenti condizioni sperimentali: gruppo controllo, gruppo SLS (0,01 mg/L), gruppo BRG (5 mg/L) e gruppo Mix (SLS 0,01 mg/L + BRG 5 mg/L). L'estratto di bergamotto, ricco in composti bioattivi con proprietà antiossidanti, è stato testato come potenziale agente mitigante del danno cellulare indotto dal tensioattivo già noto per i suoi effetti tossici.

I test effettuati mediante colorazione TB e NR hanno evidenziato come l'esposizione al laurilsolfato di sodio determini una riduzione significativa della vitalità cellulare sia negli emociti che negli epatociti. Gli emociti trattati con SLS presentavano una riduzione della vitalità statisticamente significativa ($p < 0,01$) rispetto al gruppo controllo nel saggio TB e rispetto agli emociti delle cozze trattate con BRG ($p < 0,05$) (Tabella 15). Nessun risultato significativo è stato osservato nelle cellule emolinfatiche testate mediante colorazione NR, dove comunque si riscontra una minima riduzione di vitalità nell'esposizione a SLS.

Risultati analoghi sono stati osservati nelle cellule della ghiandola digestiva. Gli epatociti saggiati mediante colorazione TB nei gruppi controllo, BRG e Mix hanno mostrato percentuali di vitalità comparabili e non significativamente diverse tra loro. Una leggera diminuzione della vitalità è stata osservata per entrambe le colorazioni nelle cellule degli organismi esposti a laurilsolfato di sodio, risultando significativa rispetto agli altri tre gruppi sperimentali quando colorate mediante NR ($p < 0,01$).

Tabella 15: Saggi di vitalità cellulare degli emociti e delle cellule di ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* trattate con laurilsolfato di sodio, estratto di bucce di bergamotto (BRG) e la loro miscela per quattordici giorni. I test sono stati condotti mediante i saggi colorimetrici TB e NR.

Gruppi Sperimentali	Saggio	Controllo (0 mg/L)	SLS (0,01 mg/L)	BRG (5 mg/L)	Mix (0,01 + 5 mg/L)
Vitalità Emociti	TB	98,5 ± 0,5 ^a	93,5 ± 0,8 ^b	97,2 ± 0,8 ^a	96,0 ± 0,9 ^a
	NR	97,4 ± 0,7	97,3 ± 0,7	99,2 ± 0,4	97,6 ± 1,0
Vitalità cellule della ghiandola digestiva	TB	98,5 ± 0,3	97,8 ± 0,5	98,8 ± 0,2	98,7 ± 0,3
	NR	98,9 ± 0,2 ^a	97,5 ± 0,4 ^b	98,7 ± 0,2 ^a	99,0 ± 0,2 ^a

I risultati sono espressi come percentuale media di vitalità ± errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative ($p < 0,05$, ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Tukey).

L'alterazione nella capacità di inglobare lieviti è risultata modificata in modo diverso nei differenti trattamenti (Figura 60). La percentuale di emociti in grado di effettuare fagocitosi nel controllo è stata pari al 93,4% delle cellule totali. Tale percentuale ha subito un drastico e significativo decremento negli emociti degli esemplari trattati con laurilsolfato di sodio, che presentavano un'attività fagocitaria ridotta al 29,5% ($p < 0,01$). Al contrario, una percentuale comparabile con quella osservata nel gruppo controllo è stata riscontrata per le cellule degli esemplari trattati con BRG, dove la capacità fagocitaria si è mantenuta al 91,3%, senza differenze significative ($p > 0,05$).

Nel gruppo Mix si è osservato un andamento intermedio, con percentuali di attività fagocitaria (74,3%) a metà tra quelle osservate nel gruppo esposto a BRG e quelle del

gruppo trattato con laurilsolfato di sodio, presentando una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo ($p < 0,01$). La riduzione di vitalità osservata nel gruppo SLS è risultata significativa sia rispetto alle cellule dei mitili esposti al solo BRG che a quelle esposte al Mix ($p < 0,01$). La comparazione tra Mix e BRG ha evidenziato una riduzione significativa dell'abilità fagocitaria nel Mix rispetto al BRG ($p < 0,01$).

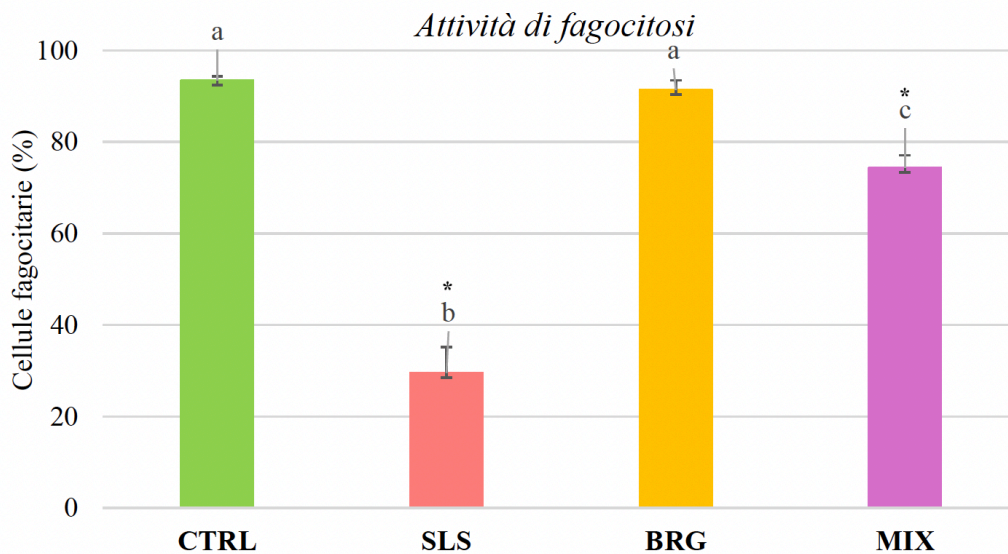


Figura 60: Attività fagocitaria degli emociti confrontata in diverse condizioni sperimentali, ovvero esemplari di *M. galloprovincialis* esposti a laurilsolfato di sodio (SLS): 0,01 mg/L; estratto di bucce di bergamotto (BRG): 5 mg/L e la loro miscela (SLS + BRG): 0,01 + 5 mg/L (per 14 giorni). I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via seguita dal test post-hoc di Tukey ed espressi come media (delle cellule fagocitarie) \pm ES. L'asterisco (*) sopra le colonne rappresenta differenze significative tra i gruppi sperimentali trattati e il controllo ($p < 0,01$). Lettere diverse sopra le colonne rappresentano differenze significative tra i gruppi trattati con SLS, BRG e la miscela di entrambi ($p < 0,01$).

Il test RVD non ha riportato risultati statisticamente significativi, ma l'esposizione al laurilsolfato di sodio e al Mix ha mostrato alterazioni rispetto al gruppo controllo e al gruppo esposto al solo BRG (Figura 61). Le cellule del controllo hanno mostrato un incremento del volume del 23,0%, con picco raggiunto durante IPO6 e ritorno al valore

iniziale al termine della prova. Le cellule trattate con bergamotto, pur tornando al loro volume iniziale dopo la somministrazione della soluzione ipotonica, hanno mostrato un incremento volumetrico del 13,2%, raggiungendo il picco di massimo rigonfiamento precocemente rispetto al controllo (IPO3). I mitili trattati con laurilsolfato di sodio e Mix hanno mostrato percentuali di incremento del volume cellulare intermedie tra controllo e gruppo BRG (21,0% e 17,0% rispettivamente, raggiunti a IPO5 e IPO4). Tuttavia, in entrambi i casi, al rigonfiamento è seguito un raggrinzimento cellulare, con le cellule di ghiandola digestiva esposte a laurilsolfato di sodio e Mix incapaci di recuperare il loro volume originale. Le cellule del Mix hanno presentato un raggrinzimento inferiore rispetto a quelle esposte al solo laurilsolfato di sodio, indicando un parziale recupero dal danno.

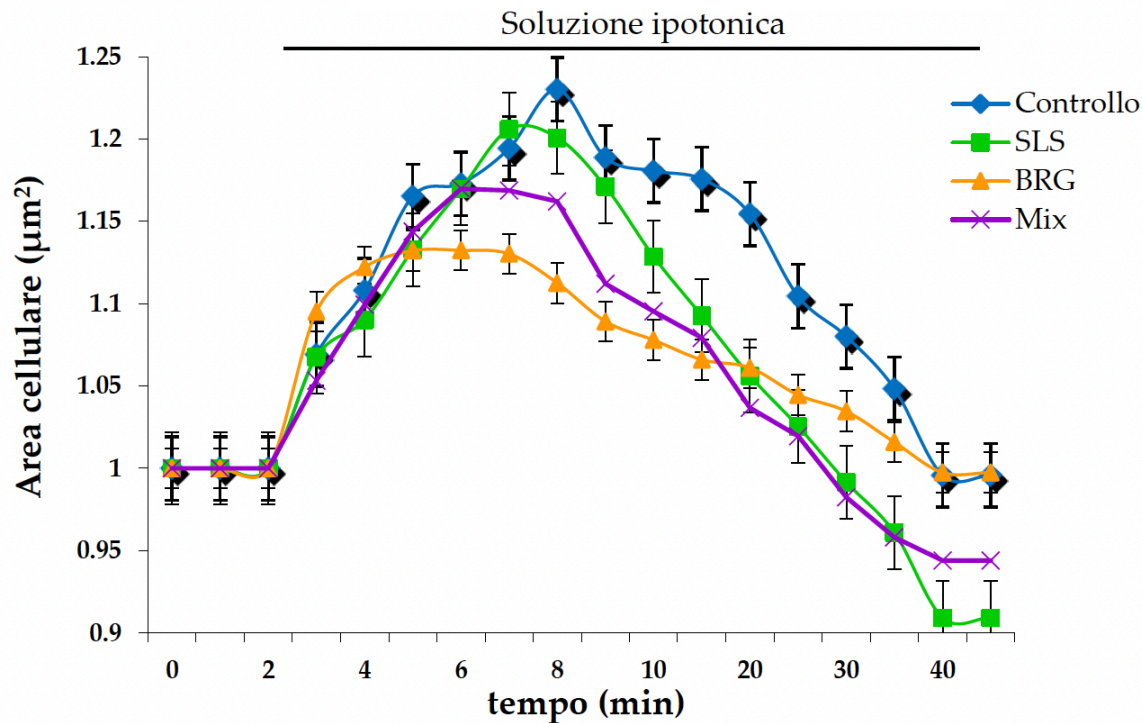


Figura 61: Regolazione del volume cellulare di cellule di ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* esposte a laurilsolfato di sodio, estratto di buccia di bergamotto (BRG) e la loro miscela. I dati sono espressi come media dei valori \pm errore standard di minimo 15 cellule selezionate. Controllo (\blacklozenge), SLS (\blacksquare), BRG (\blacktriangle) e Mix (\times). Non sono state osservate differenze significative tra controllo e trattati (ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Tukey).

L'esposizione a laurilsolfato di sodio, bergamotto e alla loro miscela ha determinato cambiamenti nel numero delle placche bissali e nella loro lunghezza (Tabella 16 e Figura 62). Il numero di placche nel gruppo trattato con SLS ($60,75 \pm 19,31$) è risultato significativamente inferiore rispetto al controllo ($102,75 \pm 14,93$), con un'ulteriore riduzione significativa nel gruppo Mix ($38,00 \pm 29,47$). Al contrario, il bergamotto non ha influenzato il numero di placche ($101,75 \pm 30,18$). L'analisi statistica ha indicato che le medie tra controllo e Mix, e tra bergamotto e Mix, erano significativamente diverse ($p < 0,05$). Per quanto riguarda la lunghezza delle placche, si è osservata una riduzione significativa rispetto al gruppo controllo ($0,75 \pm 0,14$ mm). Nei gruppi SLS e BRG, la

lunghezza media è stata rispettivamente di $0,61 \pm 0,12$ mm e $0,61 \pm 0,11$ mm, mentre nel gruppo Mix è risultata di $0,65 \pm 0,14$ mm. L'analisi statistica ha rivelato una differenza statisticamente significativa tra il controllo e tutti i gruppi sperimentali ($p < 0,05$).

Tabella 16: Numero e lunghezza delle placche bissali di *M. galloprovincialis* rilevate mediante stereomicroscopio nei gruppi controllo e di trattamento (SLS, BRG, Mix). I dati sono presentati come media \pm DS di analisi in doppio.

Parametro	Controllo	SLS (0,010 mg/L)	BRG (5 mg/L)	Mix (0,010 mg/L SLS + 5 mg/L BRG)
Numero di placche bissali	102,75 \pm 14,93 ^a	60,75 \pm 19,31 ^b	101,75 \pm 30,18 ^{a'c}	38,00 \pm 29,47 ^{b'c}
Lunghezza delle placche (mm)	0,76 \pm 0,14 ^a	0,61 \pm 0,13 ^b	0,61 \pm 0,11 ^{b'c}	0,65 \pm 0,14 ^{b'c'd}

^{a-d}: lettere diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$, test post hoc HSD di Tukey).

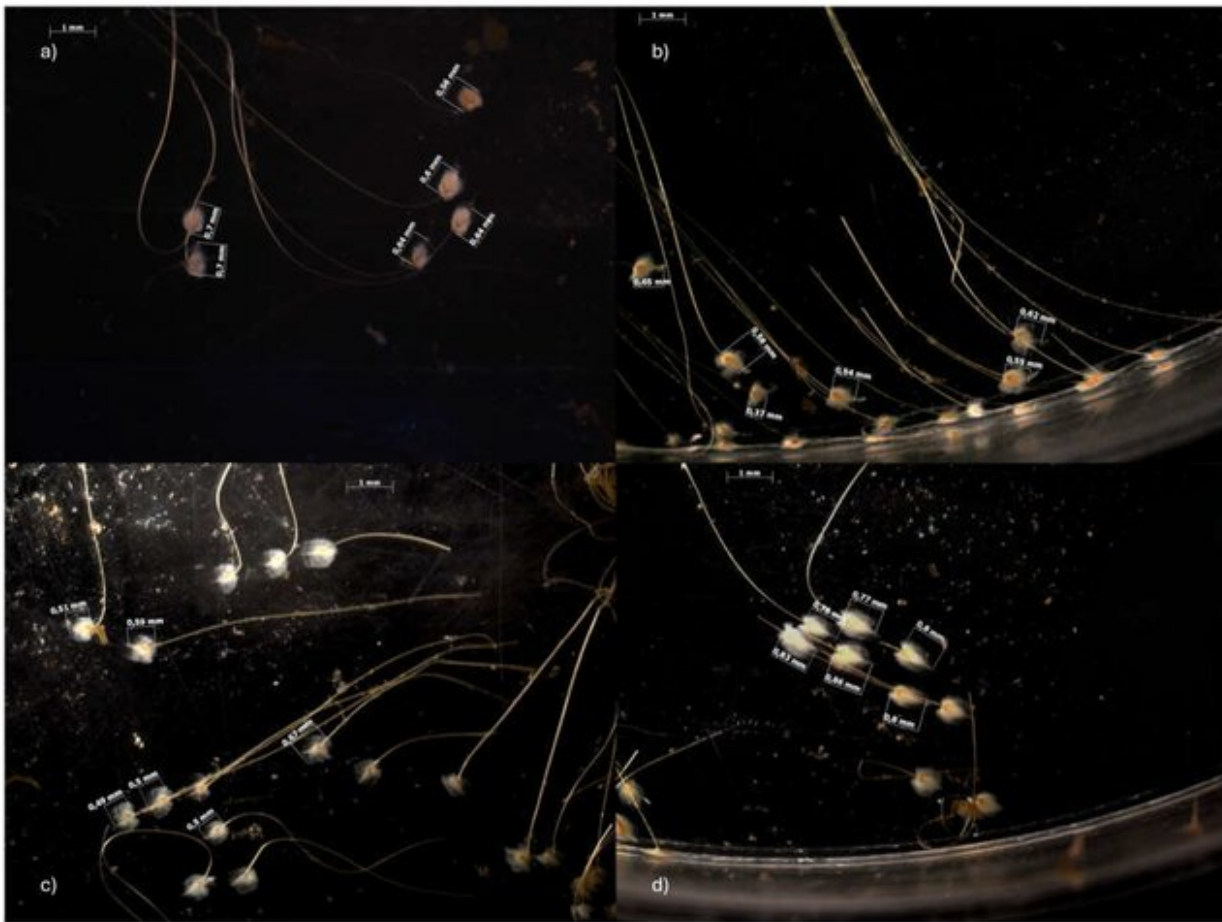


Figura 62: Immagini rappresentative del bisso dei mitili acquisite mediante stereomicroscopio AxioCam MRc 5 e software AxioVision AC Rel. 4.5. Le immagini mostrano i cambiamenti nella lunghezza delle placche dal gruppo controllo (a) ai gruppi di esposizione SLS (b), BRG (c) e Mix (d) dopo 14 giorni di esposizione.

5.9.2. CMIT e BPHs

I risultati di questo studio sono oggetto di un manoscritto attualmente in fase di sottomissione. L'obiettivo è stato quello di valutare il potenziale protettivo degli idrolizzati proteici di *H. illucens* (BPHs) contro gli effetti tossici del metilcloroisotiazolinone (CMIT) in esemplari di *M. galloprovincialis*. L'esperimento ha previsto l'esposizione per 14 giorni alle seguenti condizioni sperimentali: gruppo

controllo (CTR), gruppo CMIT (0,01 mg/L), gruppo BPHs (0,5 mg/mL) e gruppo Mix (CMIT + BPHs). Gli idrolizzati proteici della mosca soldato nera, composti bioattivi con proprietà antiossidanti e protettive, sono stati testati come potenziali agenti mitiganti del danno cellulare indotto dal noto biocida.

I saggi colorimetrici hanno dimostrato una tendenza coerente tra i diversi metodi di valutazione (Tabella 17). Il test di ritenzione NR ha evidenziato una riduzione significativa della stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti nei gruppi esposti a CMIT rispetto al controllo ($p < 0,05$). I gruppi trattati con BPHs non hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto al controllo. Al contrario, è stato osservato un significativo recupero della vitalità cellulare nei gruppi trattati con Mix rispetto a quelli esposti al solo CMIT ($p < 0,05$). Per quanto riguarda il test di esclusione TB, è stato osservato un trend simile in tutti i gruppi sperimentali.

Un pattern analogo è stato osservato nelle cellule isolate della ghiandola digestiva. Nello specifico, il saggio di ritenzione NR ha rivelato una diminuzione significativa della stabilità delle membrane lisosomiali nei gruppi esposti a CMIT rispetto al controllo ($p < 0,05$). I gruppi trattati con BPHs non hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto al controllo. Notevolmente, i gruppi trattati con Mix hanno mostrato un significativo recupero della vitalità cellulare rispetto ai gruppi esposti al solo CMIT ($p < 0,05$). Un trend comparabile è stato osservato anche nel test di esclusione TB per tutti i gruppi sperimentali.

*Tabella 17: Saggi di vitalità cellulare degli emociti e delle cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* esposti a CMIT, idrolizzati proteici di *H. illucens* e alla loro miscela per 14 giorni.*

Gruppo Sperimentale	Saggio	CTR	CMIT	BPHs	Mix
			(0,01 mg/L)	(0,5 mg/mL)	(0,01 mg/L CMIT + 0,5 MG/ML BPHs)

Emociti	NR	98,8 ± 0,4 ^a	96,5 ± 0,5 ^b	98,1 ± 0,5 ^a	97,6 ± 0,7 ^c
	TB	98,9 ± 0,8 ^a	97,7 ± 0,9 ^b	98,0 ± 0,4 ^a	97,9 ± 1,0 ^a
Cellule della ghiandola digestiva	NR	99,0 ± 0,4 ^a	96,5 ± 0,5 ^b	98,2 ± 0,5 ^a	97,6 ± 0,7 ^c
	TB	99,2 ± 0,8 ^a	97,7 ± 0,9 ^b	98,7 ± 0,4 ^a	97,9 ± 1,0 ^c

I dati sono presentati come media ± ES di analisi in triplicato. ^{a-c}: lettere diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per il dato parametro ($p < 0,05$).

Il saggio di attività fagocitaria ha dimostrato alterazioni significative tra le concentrazioni sperimentali (Figura 63). Particolarmente, l'esposizione a CMIT ha ridotto significativamente l'attività fagocitaria ($p < 0,01$). Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i gruppi trattati con BPHs e il controllo. Infine, è stato osservato un recupero nella capacità fagocitaria nei gruppi Mix rispetto ai gruppi esposti a CMIT ($p < 0,01$). Un trend simile è stato osservato e quindi confermato dall'espressione genica della γ -actina nelle diverse condizioni sperimentali.

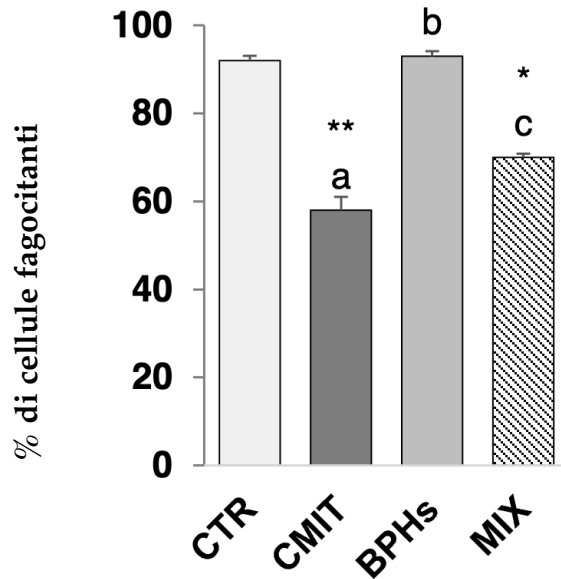


Figura 63: Percentuale di emociti fagocitanti di mitili esposti a CMIT (0,01 mg/L), BPHs (0,5 mg/mL) e alla loro miscela (MIX: CMIT + BPHs) per 14 giorni. I dati sono espressi come media \pm S.E. L'asterisco (*) sopra le colonne indica differenze significative tra i gruppi trattati e il controllo ($p < 0,01$). Lettere diverse sopra le colonne indicano differenze significative tra i gruppi trattati ($p < 0,01$).

Il saggio RVD ha dimostrato cambiamenti fisiologici nei meccanismi di trasporto di membrana delle cellule isolate della ghiandola digestiva (Figura 64). Specificamente, le cellule appartenenti ai gruppi esposti a CMIT hanno dimostrato significative alterazioni fisiologiche nella capacità di ripristinare il loro volume dopo l'esposizione a shock ipotonico rispetto al gruppo controllo ($p < 0,01$). Le cellule trattate con BPHs non hanno mostrato differenze significative rispetto al controllo. Al contrario, i mitili esposti al Mix hanno mostrato un recupero nella capacità fisiologica delle cellule isolate della ghiandola digestiva di ripristinare il loro volume dopo lo shock ipotonico rispetto a quelli esposti al solo CMIT ($p < 0,05$).

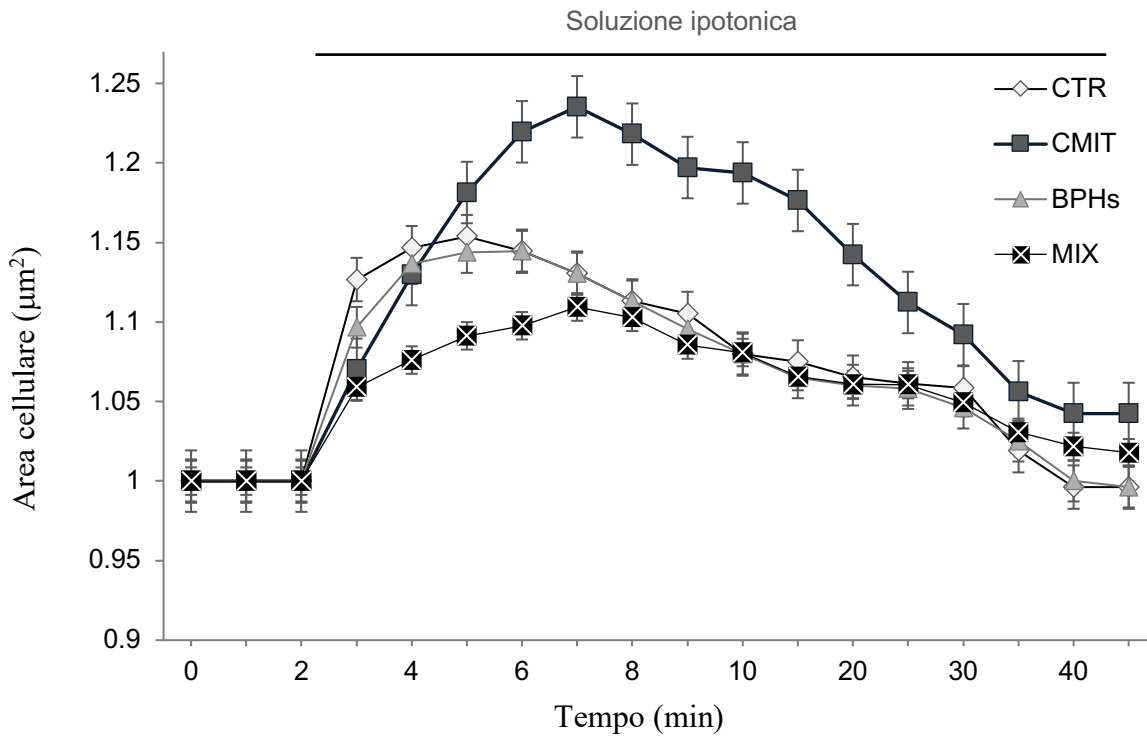


Figura 64: RVD nelle cellule isolate della ghiandola digestiva in mitili esposti a CMIT, idrolizzati proteici di *H. illucens* e alla loro miscela per 14 giorni. I dati sono espressi come media \pm ES di 15 cellule selezionate casualmente. I rombi (\blacklozenge) rappresentano il gruppo CTR; i quadrati (\blacksquare) rappresentano il gruppo CMIT; i triangoli (\blacktriangle) rappresentano il gruppo BPHs; le (X) rappresentano il gruppo Mix. La linea ipotonica evidenzia l'inizio della fase sperimentale con la soluzione ipotonica. "*" e "***" rappresentano differenze significative tra i gruppi trattati e il controllo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ rispettivamente).

6. DISCUSSIONI

Il presente capitolo si propone di analizzare e interpretare i risultati sperimentali esposti nel capitolo precedente, collocandoli nel più ampio contesto scientifico delineato nell'introduzione. L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi era valutare gli effetti di una selezione eterogenea di contaminanti emergenti (CE), includendo biocidi, tensioattivi, polimeri, additivi plastici e residui farmaceutici, su organismi sentinella marini, quali *M. galloprovincialis* e *P. imbricata*. Adottando un approccio multilivello, che spazia dalla vitalità cellulare a risposte biochimiche e fisiologiche complesse, questa sezione si prefigge di elucidare i meccanismi di tossicità alla base delle alterazioni osservate. I risultati ottenuti hanno confermato la sensibilità degli organismi modello agli agenti inquinanti testati, evidenziando una serie di risposte cellulari comuni, come la compromissione dell'integrità delle membrane, l'alterazione delle capacità immunitarie (fagocitosi) e l'induzione di stress ossidativo. Allo stesso tempo, sono emerse specificità legate alla natura chimica del contaminante e alla specie considerata. Parallelamente alla caratterizzazione del danno ecotossicologico, un secondo pilastro di questa ricerca ha riguardato l'esplorazione di strategie di mitigazione basate su bioprodotto di origine naturale, come l'estratto di bergamotto e gli idrolizzati proteici da *H. illucens*. La discussione valuterà quindi l'efficacia di questi composti nel contrastare gli effetti avversi dei CE, offrendo una prospettiva applicativa innovativa.

La discussione sarà articolata in sezioni dedicate a ciascun esperimento, confrontando i dati ottenuti con la letteratura esistente e proponendo interpretazioni dei meccanismi d'azione. Infine, i risultati complessivi verranno sintetizzati in una prospettiva "One Health", sottolineando come il monitoraggio della salute degli ecosistemi acquatici sia

un tassello fondamentale per la salvaguardia della salute ambientale e, indirettamente, di quella umana.

6.1. BIT

Negli ultimi dieci anni, l'uso del BIT nella formulazione di diversi prodotti di consumo è aumentato significativamente (Novick et al., 2012). Prodotti per la cura della persona, detergenti per la casa e biocidi industriali che sfruttano le proprietà conservanti di questa molecola sono comuni sul mercato globale e vengono riversati nell'ambiente al termine del loro ciclo di vita. Con un tempo di degradazione ambientale superiore ai 30 giorni (o superiore a 3 mesi, per le proprietà biocide, se esposto alla luce solare) (Lugg, 2001; Epa, 2009), il BIT persiste negli ecosistemi, generando una crescente preoccupazione per i suoi potenziali effetti sulla fauna acquatica.

Per monitorare i danni causati alle comunità marine, il mitilo mediterraneo, *M. galloprovincialis*, si è dimostrato un ottimo modello sentinella (Impellitteri et al., 2024b; Filice et al., 2024). In particolare, gli emociti e le cellule della DG dei mitili sono target di grande valore per testare gli effetti di potenziali contaminanti, dato il loro ruolo chiave nei meccanismi di difesa, digestione e metabolismo (Curpan et al., 2022; Pagano et al., 2023; Cruz et al., 2023). In quest'ottica, l'approccio *in vitro* è fondamentale per comprendere le risposte cellulari specifiche prima di valutare gli effetti di un contaminante emergente tramite esposizioni *in vivo* (Multisanti et al., 2023; Prego-Faraldo et al., 2015; Impellitteri et al., 2023). Inoltre, l'esposizione a breve termine permette di identificare l'innescò di risposte cellulari precoci, ponendo le basi per lo sviluppo di biomarker specifici per lo studio di risposte cellulari a lungo termine. Il presente studio dimostra che il calo di vitalità degli emociti osservato durante

L'esposizione a diverse concentrazioni di BIT è indicativo di un'interazione tra la sostanza chimica e *M. galloprovincialis*. La riduzione significativa della vitalità cellulare dopo 3 ore di esposizione alla concentrazione più alta può essere un chiaro segnale di alterata stabilità della membrana lisosomiale e di effetti citotossici (Impellitteri et al., 2024c; Multisanti et al., 2024; Porretti et al., 2023). I lisosomi, essendo direttamente coinvolti nei meccanismi di difesa e nella risposta a stress esterni, subiscono un'alterazione della loro capacità adattativa che, a sua volta, porta a una riduzione della vitalità cellulare (Canesi et al., 2007). Questa diminuzione della vitalità, dipendente dalla dose e dal tempo di esposizione, è una risposta comune degli emociti di organismi marini esposti a contaminanti, come già osservato *in vitro* negli emociti del bivalve *Pinctada imbricata* trattato con il conservante Quaternium-15 (Multisanti et al., 2023). Questi risultati sono strettamente correlati all'alterazione della capacità di fagocitosi, uno dei principali meccanismi di difesa che implica la fusione tra lisosomi e fagosomi (Burgos-Aceves & Faggio, 2017). L'esposizione al BIT ha causato, infatti, una drastica riduzione di questa capacità, con una percentuale inferiore al 20% di cellule in grado di fagocitare dopo 3 ore di esposizione alla concentrazione più elevata. Ciò sottolinea l'impatto negativo del BIT sulla funzionalità cellulare, con effetti potenzialmente dannosi sui recettori di superficie che non sono più in grado di avviare il processo fagocitario, come già riportato in altri studi su *M. galloprovincialis* in condizioni di stress (Multisanti et al., 2023; Parisi et al., 2021; Panebianco et al., 2023). Al contrario, i risultati sulla vitalità delle cellule della ghiandola digestiva hanno mostrato un precoce adattamento allo stress indotto dal BIT. Un'assenza di variazione o persino un aumento della vitalità, specialmente al primo tempo di esposizione (T1), potrebbe essere collegata all'incremento dei livelli di SOD, come suggerito dai dati di espressione genica, probabilmente a causa di un maggiore sforzo cellulare per contrastare l'azione negativa

del composto (Messina et al., 2014). Tali risultati sono in linea con quanto già osservato in altri test *in vivo* su cellule DG di *M. galloprovincialis* (Pagano et al., 2022). Tuttavia, la tossicità del BIT è confermata dal fatto che la riduzione di vitalità osservata è coerente con lavori precedenti che ne hanno valutato gli effetti su zebrafish, dove un'esposizione a 0.2 mmol/L ha causato il 100% di mortalità (Li et al., 2016). Gli effetti avversi del BIT sulle cellule DG sono stati ulteriormente evidenziati dall'alterata capacità di regolare il volume cellulare (RVD) in risposta a stress osmotico. In condizioni normali, le cellule DG dei bivalvi sono in grado di gonfiarsi (swell) e sgonfiarsi (shrink) per ripristinare il loro volume originale se esposte a soluzioni iper- o ipo-osmotiche (Hoffmann et al., 2009). In condizioni di stress, questa capacità può essere compromessa. Questo è quanto accaduto nelle cellule DG esposte alla concentrazione più alta di BIT, che hanno mostrato un'evidente incapacità di tornare alla forma iniziale dopo 1 e 3 ore. Questi risultati possono essere attribuiti a un danno ai canali proteici o al citoscheletro, causato dall'interazione con il BIT, una molecola nota per causare denaturazione e inattivazione delle proteine (Collier et al., 1990a,b). Risultati analoghi sono stati, infatti, documentati in uno studio *in vivo* su *M. galloprovincialis* esposto ad altri conservanti utilizzati in prodotti di consumo (Impellitteri et al., 2024c).

6.2. OIT

Dato il crescente rilevamento dell'Ottile isotiazolinone (OIT) negli ecosistemi acquatici, il presente studio ha investigato i suoi impatti cellulari e fisiologici su *M. galloprovincialis*, un organismo sentinella chiave. L'analisi dei risultati ha rivelato un andamento tossicologico peculiare e coerente attraverso tutti i saggi condotti: la concentrazione

inferiore di OIT (E1) ha indotto la massima citotossicità, mentre la concentrazione più elevata (E2) ha sorprendentemente mostrato un effetto meno marcato.

Questa risposta dose-dipendente non lineare suggerisce l'attivazione di potenti meccanismi di difesa o detossificazione solo a fronte di uno stress più elevato. È plausibile che, superata una certa soglia di tossicità, l'organismo inneschi risposte compensatorie a livello molecolare, come già ipotizzato per altre sostanze che agiscono su vie metaboliche complesse (Gostyukhina et al., 2022). Questa notevole capacità di adattamento è coerente con la nota resilienza di *M. galloprovincialis* alle sfide ambientali, come dimostrato da studi che non hanno riscontrato alterazioni negli indici di condizione di esemplari provenienti da siti altamente inquinati (Aafaf et al., 2017).

Questo andamento controintuitivo è stato costantemente riflesso nei saggi di vitalità. Sia la compromissione delle membrane lisosomiali (saggio NR) sia la perdita di integrità della membrana plasmatica (saggio TB) sono risultate massime alla concentrazione E1, per poi attenuarsi a E2. La concordanza di questi risultati avvalorava l'ipotesi di una risposta complessa, dove la morte cellulare osservata può essere interpretata come una strategia dell'organismo per mantenere l'omeostasi complessiva di fronte a uno stress di media intensità.

Le conseguenze funzionali di questa esposizione sono state chiaramente illustrate dall'analisi della fagocitosi. Coerentemente con i dati di vitalità, l'attività fagocitaria ha subito un crollo marcato già alla concentrazione inferiore, indicando una profonda compromissione del sistema immunitario. Tuttavia, alla concentrazione più alta si è osservato un leggero recupero, un dato che rafforza l'ipotesi dell'attivazione di meccanismi adattativi volti a mitigare il danno indotto dall'inquinante (Palladino et al., 2023).

Infine, il saggio RVD ha fornito ulteriori dettagli sul danno funzionale. Sebbene non siano emerse alterazioni macroscopiche, un'analisi più approfondita ha rivelato che le cellule esposte a OIT non sono state in grado di ripristinare il loro volume originale dopo lo shock ipotonico. Inoltre, hanno mostrato un rigonfiamento maggiore rispetto al controllo, con una risposta ancora più rapida nel gruppo E2. Questo fallimento nella regolazione osmotica indica un danno ai canali ionici o al citoscheletro, meccanismi la cui alterazione è coerente con i risultati degli altri saggi (Barmo et al., 2013), e conferma che, nonostante l'apparente recupero di vitalità a dosi più alte, il danno sub-letale a livello funzionale permane.

6.3. Quaternium-15

6.3.1. Mytilus galloprovincialis

Nel presente studio, gli effetti del Quaternium-15 sono stati indagati focalizzandosi sulla ghiandola digestiva (DG) e sulle branchie di *M. galloprovincialis*, organi che rappresentano endpoint chiave per la loro funzione di accumulo, detossificazione e primo contatto con gli xenobiotici. L'analisi ha rivelato una risposta tossicologica complessa, modulata sia dalla concentrazione che dalla durata dell'esposizione.

L'interazione iniziale tra il contaminante e le cellule della DG si è manifestata attraverso un'alterazione della stabilità lisosomiale. È significativo notare che, dopo 14 giorni di esposizione, la concentrazione più bassa di Quaternium-15 non ha influenzato la vitalità cellulare misurata dal saggio NR. Questo risultato suggerisce l'attivazione di meccanismi di adattamento, evidenziando la notevole resilienza che permette ai mitili di acclimatarsi a condizioni di stress sub-letale (Lassoued et al., 2019).

Tuttavia, l'impatto funzionale del Quaternium-15 è emerso con maggiore complessità e gravità attraverso il saggio RVD, che ha svelato un danno profondo ai meccanismi di regolazione osmotica. Già dopo 7 giorni, la concentrazione più alta (E2) ha indotto una significativa compromissione, con le cellule che mostravano una ridotta reattività allo shock ipotonico, indicando un'inibizione diretta delle componenti responsabili degli aggiustamenti di volume.

Il quadro si è fatto ancora più articolato dopo 14 giorni di esposizione. A bassa concentrazione (E1), pur non raggiungendo la significatività statistica, è emerso un danno funzionale specifico e grave: le cellule erano in grado di gonfiarsi, ma perdevano completamente la capacità di ripristinare il loro volume originale. Questo blocco funzionale suggerisce un danno mirato a componenti vitali come il citoscheletro e i sistemi di trasporto ionico di K^+ e Cl^- , essenziali per la fase di recupero del volume (Torre et al., 2013).

In questo contesto, il risultato più controintuitivo è stato osservato nelle cellule esposte alla concentrazione più alta (E2) per 14 giorni. Contrariamente alle aspettative, queste cellule sembravano recuperare parzialmente la capacità di ridurre il proprio volume dopo il rigonfiamento. Questo fenomeno paradossale, apparentemente un miglioramento in condizioni di stress estremo, potrebbe in realtà riflettere un fenomeno di selezione cellulare: è possibile che solo le cellule più resistenti siano sopravvissute all'esposizione prolungata e che queste attivino risposte compensatorie o alterate per gestire il danno, portando a un comportamento funzionale anomalo ma misurabile. Questa risposta non lineare evidenzia la complessità degli effetti del Quaternium-15, che vanno oltre una semplice relazione dose-risposta.

6.3.2. *Pinctada imbricata*

Nel presente studio, è stata valutata per la prima volta l'immunotossicità del Quaternium-15 sugli emociti di *P. imbricata*, analizzandone la risposta allo stress attraverso un trattamento *in vitro*. In letteratura sono disponibili pochi dati sulla citotossicità del Quaternium-15. Tuttavia, è noto che nell'uomo può causare dermatiti a causa del facile rilascio di formaldeide in soluzioni acquose, indipendentemente dal pH (Lv et al., 2015; Shaughnessy et al., 2014). La tossicità della formaldeide è stata invece ampiamente studiata e sembra indurre stress ossidativo attraverso l'inibizione del complesso I della catena respiratoria mitocondriale (Teng et al., 2001), direttamente associato alla produzione di ATP e alla riduzione dell'ossigeno in acqua. Una riduzione parziale o scorretta dell'O₂ porta a un aumento della generazione di ROS. La diffusa presenza di questo conservante nei prodotti di uso domestico ha focalizzato il nostro interesse sulla comprensione della sua tossicità cellulare. Pertanto, l'obiettivo di questa indagine era analizzare la risposta difensiva in un potenziale nuovo organismo modello che, secondo un nostro recente studio (Pagano et al., 2023), possiede le caratteristiche di un idoneo bioindicatore per gli ambienti acquatici. I risultati ottenuti dai saggi di vitalità cellulare hanno mostrato che la vitalità ha subito una diminuzione dose-dipendente e tempo-dipendente, dimostrando la citotossicità del contaminante. Questo andamento è in accordo con un'indagine *in vivo* condotta sul mitilo mediterraneo, *M. galloprovincialis* (Marks et al., 1998) e con uno studio recente che ha rivelato una tendenza simile in esemplari di *M. galloprovincialis* esposti allo stesso composto (Faggio et al., 2016). Pertanto, i nostri risultati, combinati con le evidenze esistenti in letteratura, confermano la citotossicità del Quaternium-15 verso gli emociti.

L'attività di fagocitosi è uno degli eventi principali della difesa immunitaria degli invertebrati. Il processo consiste in due fasi: la fusione di lisosomi e fagosomi, seguita dall'azione di enzimi specifici in grado di degradare le particelle estranee (Pagano et al., 2023). La fagocitosi è inoltre guidata da una varietà di segnali e coinvolge sia recettori di superficie sia processi di riorganizzazione del citoscheletro di actina (Mateo et al., 2010; May and Machesky, 2001; Panara et al., 1996). Nel presente studio, i risultati hanno dimostrato una riduzione significativa della capacità degli emociti di compiere la fagocitosi, con l'effetto più marcato osservato al tempo di esposizione più lungo e alla concentrazione più alta di Quaternium-15. Questa riduzione è stata osservata anche in studi precedenti (Mateo et al., 2010), suggerendo una relazione tra la ridotta performance fagocitaria, l'alterazione dell'organizzazione citoscheletrica e una diminuita capacità di aggregazione cellulare, un altro evento chiave nel processo fagocitario.

6.4. PVA

Il saggio di vitalità cellulare condotto in questo studio su *M. galloprovincialis*, ha mostrato un'interazione negativa tra il PVA e i mitili. In particolare, i risultati significativi ottenuti con il saggio TB alla concentrazione più alta suggeriscono un'alterazione delle membrane lisosomiali, che non sono state in grado di impedire la penetrazione del colorante all'interno delle cellule. Il danno osservato negli emociti si è riflesso in una lieve diminuzione della vitalità delle cellule della DG dopo un trattamento di quattordici giorni. Tuttavia, il tasso di mortalità osservato in condizioni sperimentali è risultato paragonabile a quello riportato nei pochi studi esistenti in letteratura. Specificamente, l'esposizione di *Paracentrotus lividus* e *Daphnia magna* a concentrazioni rilevanti di PVA ha prodotto una bassa mortalità o immobilità (Alonso-López et al., 2021; Nigro et al.,

2022). Questo basso tasso di mortalità è probabilmente attribuibile alle notevoli capacità adattative di *Mytilus spp.*, che permettono loro di resistere a condizioni di stress ambientale modificando i propri processi fisiologici (Nardi et al., 2017) attraverso l'attivazione di segnali di trasduzione che facilitano l'immediata riparazione del danno (Yao and Somero, 2013). È importante notare, tuttavia, che un'esposizione prolungata a dosi elevate di contaminanti può causare una perdita di vitalità cellulare, come osservato in studi precedenti con altri composti usati nei PCPs (Impellitteri et al., 2025).

Per quanto concerne il saggio dell'RVD, la perdita della capacità di regolare il volume delle cellule DG è risultata differente tra le due concentrazioni testate. Le cellule esposte a PVA1 hanno mostrato un aspetto "raggrinzito" rispetto al volume iniziale, mentre quelle esposte a PVA2 tendevano a gonfiarsi senza più tornare alla forma originale. Questo danno può essere attribuito ad alterazioni a livello delle proteine canale o del citoscheletro. Nonostante la scarsità di dati sul PVA, un danno analogo è stato documentato in altre indagini su cellule di *M. galloprovincialis* esposte a PCPs (Impellitteri et al., 2023; Pagano et al., 2016), inclusa un'alterazione dell'RVD osservata dopo esposizione a un altro polimero idrosolubile, il polietilenglicole (Multisanti et al., 2024).

Per quanto riguarda i parametri biochimici, i livelli degli elettroliti sono rimasti inalterati al termine della fase sperimentale, ad eccezione di un leggero aumento del Fosforo. Ciò mostra una limitata influenza del PVA dopo due settimane di esposizione, suggerendo la necessità di analisi a più lungo termine. La bassa variabilità osservata è in linea con la bassa mortalità, poiché molti degli elettroliti analizzati sono coinvolti in funzioni vitali come metabolismo, formazione del guscio, osmoregolazione e omeostasi (Tresnakova et al., 2023b). L'aumento significativo del Fosforo potrebbe essere correlato a uno stato di

stress ossidativo indotto dall'interazione tra la più alta concentrazione di PVA e le cellule, come suggerito dai risultati relativi alla SOD.

La generazione di ROS e l'attivazione di una risposta antiossidante in seguito all'esposizione al PVA sono state evidenziate dal significativo aumento dei livelli di carbonilazione proteica e dell'attività dell'enzima SOD nelle branchie dei mitili esposti. Un aumento di questi biomarker di stress ossidativo è stato riportato in diverse specie marine esposte a inquinanti (Almroth et al., 2008; Dalle-Donne et al., 2003; Patetsini et al., 2013). I nostri dati suggeriscono che il PVA induce stress ossidativo in *M. galloprovincialis*, con un effetto maggiore sul danno proteico, e che l'attivazione del sistema antiossidante non è sufficiente a contrastare l'azione dei ROS. È interessante notare che, a differenza delle branchie, non sono state osservate alterazioni nella DG, evidenziando una risposta tessuto-specifica, già osservata in *M. galloprovincialis* esposto ad altri contaminanti (Tresnakova et al., 2023b).

Infine, per quanto riguarda il bisso, sebbene non sia stato osservato un cambiamento significativo nel numero di filamenti, si è registrato un aumento della lunghezza delle placche di adesione in risposta al PVA. Questo andamento è simile a quanto riportato da Aldred et al. (2006), che correlarono un aumento dell'area della placca a una maggiore bagnabilità della superficie. Questo suggerisce che la performance energetica degli organismi, legata alla produzione del bisso, sia influenzata solo alle concentrazioni più elevate di questo contaminante.

6.5. PEG

Per valutare la tossicità di composti potenzialmente dannosi presenti nelle formulazioni di farmaci e prodotti per la cura della persona (PPCPs), come il Polietilenglicole (PEG), *M. galloprovincialis* si conferma un'efficace specie sentinella.

La ricerca ha dimostrato un'interazione significativa tra il PEG e *M. galloprovincialis*, che ha portato a una marcata riduzione della vitalità sia degli emociti sia degli epatociti. I risultati del saggio di ritenzione dell'NR suggeriscono una compromissione della membrana lisosomiale. Parallelamente, il saggio di esclusione del TB ha rivelato significative alterazioni della membrana sia negli emociti sia nelle cellule DG, in particolare alle alte concentrazioni di PEG (10 mg/L). Poiché le membrane cellulari sane impediscono l'ingresso del TB, l'aumento della permeabilità al colorante indica un'integrità di membrana compromessa, un risultato coerente con quello di Hatami et al. (2019), che hanno riportato un danno simile nella carpa comune (*C. carpio*) esposta alla stessa concentrazione di PEG.

L'esposizione al PEG ha avuto un impatto negativo sulla capacità delle cellule della DG di regolare il proprio volume. Questi risultati sono in linea con studi precedenti condotti su mitili esposti a sostanze chimiche legate ai PPCPs (Tresnakova et al. 2023). La perdita della capacità di regolare il volume cellulare è un chiaro segnale di alterazioni del citoscheletro, danno alle proteine canale e disfunzioni della membrana cellulare (Lionetto et al. 2003; Osei-Owusu et al. 2018).

La valutazione degli elettroliti ha mostrato che il contenuto ionico dell'emolinfa è stato solo leggermente influenzato dal PEG, senza che le variazioni raggiungessero la significatività statistica. Saranno necessarie ulteriori analisi, condotte a tempi di esposizione diversi e più lunghi, per chiarire meglio questo aspetto. Questi dati sono

comunque rilevanti in relazione alle capacità osmoregolatrici dei mitili. L'emolinfa contiene costituenti essenziali come Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , che svolgono ruoli cruciali in diverse funzioni fisiologiche, tra cui metabolismo, attività enzimatiche, sviluppo del guscio e mantenimento dell'equilibrio interno dell'organismo (Impellitteri et al. 2023).

Nel nostro studio, 14 giorni di esposizione a 10 mg/L di PEG non hanno influenzato in modo significativo lo stato ossidativo nel tessuto in esame, ad eccezione di un leggero ma significativo aumento della perossidazione lipidica nelle branchie. Al contrario, l'esposizione alla più bassa concentrazione di PEG (0.1 mg/L) ha influenzato negativamente l'attività dell'enzima SOD nelle branchie, aumentando al contempo la perossidazione lipidica. Sebbene preliminari, questi dati suggeriscono che, in *M. galloprovincialis*, una bassa concentrazione di PEG possa inibire il sistema di difesa antiossidante, limitando la capacità di eliminare i ROS e causando di conseguenza un danno ossidativo ai lipidi. La risposta tessuto-specifica non sorprende, poiché le branchie rappresentano il primo tessuto esposto ai contaminanti.

Le analisi istopatologiche, metodi sensibili e affidabili per interpretare le alterazioni tissutali indotte da stress (Gomez-Mendikute et al. 2005), hanno rivelato danni significativi in diversi organi chiave:

- Branchie: essendo a diretto contatto con gli xenobiotici durante la filtrazione e la respirazione, sono organi estremamente sensibili (Pinto et al. 2019). I danni istologici osservati suggeriscono che il PEG può compromettere la salute respiratoria e l'equilibrio ionico del mitilo.
- Epatopancreas: quest'organo, cruciale per la digestione, l'accumulo di nutrienti e la detossificazione (Limonta et al. 2024), ha mostrato per la prima volta che l'esposizione al PEG ne altera significativamente l'architettura fisiologica in modo dose-dipendente.

- Gonadi: i risultati istologici hanno mostrato gravi danni sia nelle gonadi maschili (modificazione dei testicoli) che femminili (ovociti necrotici e apoptotici). Questi dati implicano in modo inequivocabile che il PEG può agire come un fattore di stress in grado di ridurre la capacità riproduttiva di entrambi i sessi, con significative ramificazioni ecologiche per il mantenimento della popolazione.

6.6. Polietilene (MP)

Nel contesto ecotossicologico, le microplastiche vengono spesso studiate utilizzando polimeri modello come il polietilene (UHMW-PE). La sua rilevanza risiede non solo nelle dimensioni (35-50 μm), che ne facilitano l'ingestione da parte di organismi filtratori, ma anche nella sua spiccata idrofobicità, che lo rende un efficace vettore per l'adsorbimento e la concentrazione di contaminanti organici. Partendo da questo presupposto, il nostro studio ha valutato gli effetti del polietilene (MP) e della caffeina (Caff), sia singolarmente che in combinazione (Mix), sulla vitalità cellulare in *M. galloprovincialis*.

Le analisi hanno rivelato una notevole resilienza degli emociti, la cui vitalità è rimasta inalterata in tutte le condizioni sperimentali, superando il 90%. Questo dato conferma una tendenza già osservata in studi precedenti su questa specie, dove le cellule circolanti mostrano una scarsa sensibilità a diversi xenobiotici, incluse le microplastiche (Freitas et al., 2021; Kolarević et al., 2022; Roman et al., 2023).

Un quadro nettamente diverso emerge invece a carico della ghiandola digestiva (DG), un organo chiave nel metabolismo e nella detossificazione. Qui, il saggio NR ha evidenziato una significativa compromissione della vitalità cellulare in tutti i gruppi trattati, suggerendo un danno a livello delle membrane lisosomiali e cellulari. Tale danno è stato corroborato dall'analisi dell'RVD, che ha rivelato un'alterazione funzionale

specifica nel gruppo Mix: le cellule esposte alla miscela, una volta gonfiate in ambiente ipotonico, perdevano la capacità di ripristinare il loro volume fisiologico. Questa perdita di omeostasi volumetrica, già documentata come effetto di vari xenobiotici (Pagano et al., 2022; Tresnakova et al., 2023), prelude a disfunzioni enzimatiche e, potenzialmente, al cedimento dell'intero organo.

L'indagine sui meccanismi di morte cellulare ha rivelato un quadro ancora più complesso. Nonostante il danno osservato, non è stata riscontrata un'attivazione dell'apoptosi tramite caspasi-3 nel gruppo Mix. Sorprendentemente, l'esposizione alla sola caffeina ha indotto una diminuzione dell'attività di questo enzima. Sebbene in contrasto con il noto ruolo pro-apoptotico della caffeina nei vertebrati, questo fenomeno di soppressione è stato già osservato in altri bivalvi (Martyniuk et al., 2022). Poiché le conoscenze sulle caspasi in questi organismi sono ancora limitate, è plausibile che tale riduzione rifletta una modulazione della risposta infiammatoria piuttosto che un'assenza di stress (Smith et al., 2017). La combinazione di un danno funzionale (RVD) e di un'alterata via apoptotica suggerisce quindi l'attivazione di percorsi di danno cellulare distinti e complessi.

L'analisi dello stress ossidativo offre un'ulteriore chiave di lettura. Mentre la caffeina da sola non ha indotto risposte misurabili, confermando una scarsa sensibilità del mitilo a questo specifico stimolo (contrariamente ad altri invertebrati), i gruppi esposti a MP e Mix hanno mostrato chiari segni di squilibrio redox. Si è osservato un apparente paradosso: una riduzione contestuale sia dei sistemi di difesa antiossidante sia dei marcatori di danno lipidico. Questo fenomeno può essere interpretato come un esaurimento delle difese cellulari e delle riserve energetiche durante un'esposizione sub-cronica, come proposto da Shang et al. (2021). I nostri risultati si inseriscono così in un quadro letterario consolidato che evidenzia la variabilità delle risposte antiossidanti nei

bivalvi, spesso caratterizzate da una sotto-regolazione dei meccanismi di difesa (Trestrail et al., 2020).

Infine, le analisi istologiche hanno svelato un severo impatto strutturale a carico delle branchie, l'organo di primo contatto con i contaminanti. L'impatto più immediato, evidente nei gruppi esposti a MP e Mix, ha riguardato un danno meccanico e superficiale, manifestatosi con una diffusa perdita di ciglia e un deterioramento dei dischi ciliari, essenziali per la coesione dei filamenti. A ciò si è aggiunta la rottura dei bastoncelli chitinosi di sostegno, un danno attribuibile all'azione abrasiva delle microplastiche.

Questa compromissione dell'integrità strutturale ha innescato una cascata di risposte biologiche. In primo luogo, ha favorito un'intensa infiltrazione di emociti, classica reazione immunitaria osservata in tutti i gruppi trattati. Contemporaneamente, a livello cellulare, si è assistito a una degenerazione idropica delle cellule adiacenti ai dischi ciliari, che apparivano rigonfie a causa di un'alterata omeostasi ionica. Oltre a queste reazioni immediate, è emerso un meccanismo difensivo più drastico: l'esposizione alle MP ha indotto un'abbondante proliferazione cellulare che ha portato alla fusione delle lamelle branchiali adiacenti. Questo fenomeno, assimilabile a iperplasia, pur riducendo la superficie esposta agli inquinanti, ne compromette gravemente la funzionalità respiratoria e alimentare, confermando il ruolo delle branchie come bersaglio primario e altamente sensibile agli effetti degli inquinanti.

6.7. DEHT

La valutazione dello stato di salute del mitilo Mediterraneo *M. galloprovincialis*, condotta attraverso test di vitalità cellulare, ha rivelato una risposta tissutale differenziata

all'esposizione al plastificante DEHT. Mentre gli emociti hanno mantenuto una vitalità inalterata, confermando una notevole resilienza del comparto immunitario circolante, le cellule della ghiandola digestiva hanno mostrato una riduzione altamente significativa ($p \leq 0,01$) nel gruppo esposto alla concentrazione più alta (DEHT100). Tale vulnerabilità della ghiandola digestiva è coerente con la letteratura, che documenta come i plastificanti e le microplastiche possano compromettere la stabilità lisosomiale in questo organo (Von Moos et al., 2012; González-Soto et al., 2019).

Questa specificità del danno è ulteriormente evidenziata dalla discordanza con i risultati del saggio TB, che non ha rilevato alterazioni significative dell'integrità di membrana in nessun gruppo. Similmente ad altri studi (Impellitteri et al., 2023a, 2023b), questo suggerisce che il DEHT induca un danno sub-letale e funzionale prima di portare alla necrosi e alla rottura della membrana cellulare.

Il danno funzionale alla ghiandola digestiva è stato confermato in modo inequivocabile dall'analisi della regolazione del volume cellulare. L'esposizione al DEHT ha compromesso la capacità delle cellule di rispondere a uno shock ipotonico: già alla concentrazione ambientale, le cellule non sono riuscite a ripristinare il loro volume originale, mentre alla concentrazione più alta hanno mostrato un andamento irregolare e un volume finale significativamente ridotto ($p < 0,01$) rispetto al controllo. Questi risultati confermano come il DEHT si aggiunga alla lista di xenobiotici in grado di alterare questo meccanismo fisiologico fondamentale (Pagano et al., 2022; Ravi et al., 2023).

Infine, è stata indagata la risposta allo stress ossidativo, un'area ancora poco esplorata per gli inquinanti plastici in *M. galloprovincialis*. Sebbene studi su composti strutturalmente simili suggeriscano risposte enzimatiche variabili (Andreyeva et al., 2023), nelle nostre condizioni sperimentali l'esposizione al DEHT non ha indotto alcuna

alterazione significativa né nell'attività della SOD né nei marcatori di danno ossidativo (perossidazione lipidica e carbonilazione proteica). Questo risultato suggerisce che, per la durata e alle concentrazioni testate, le difese antiossidanti basali del mitilo sono state sufficienti a contrastare lo stress indotto dal DEHT, un'ipotesi che merita ulteriori approfondimenti.

6.8. Clorpromazina

L'analisi degli effetti tossicologici della clorpromazina (Cpz) ha rivelato un impatto complesso e multilivello su *M. galloprovincialis*, con risposte differenziate che si manifestano dal piano subcellulare fino a quello fisiologico-comportamentale.

A livello cellulare, la valutazione della stabilità lisosomiale ha messo in luce una vulnerabilità specifica della ghiandola digestiva. Soltanto in questo tessuto, e alla concentrazione più elevata di Cpz, si è registrata una diminuzione significativa della vitalità ($p \leq 0,01$), confermata sia dal saggio NR che dal test di esclusione con TB. Questo dato suggerisce un danno sinergico a carico delle membrane lisosomiali e cellulari, in linea con gli effetti noti di altri xenobiotici (Pagano et al., 2022; Tresnakova et al., 2023a). Al contrario, la resilienza degli emociti, la cui integrità di membrana è rimasta inalterata, indica che il danno indotto dalla clorpromazina si manifesta inizialmente come compromissione funzionale piuttosto che come mortalità cellulare acuta.

Approfondendo l'analisi del danno funzionale tramite il saggio RVD, i risultati sono apparsi più sfumati. Nonostante le chiare indicazioni di citotossicità, non sono emerse differenze statisticamente significative nella capacità di regolazione del volume cellulare. Tuttavia, si sono delineate delle tendenze interessanti: a basse concentrazioni, le cellule sembravano faticare a ripristinare il loro volume fisiologico, mentre alla

concentrazione più alta hanno mostrato pattern di contrazione atipici. Sebbene queste tendenze non raggiungano la soglia di significatività statistica, suggeriscono una potenziale alterazione dei meccanismi omeostatici che meriterebbe ulteriori indagini.

Sul piano biochimico, la risposta allo stress ossidativo ha confermato l'impatto della Cpz, rivelando uno squilibrio complessivo in direzione pro-ossidativa. L'evento scatenante sembra essere una marcata inibizione dell'attività della catalasi, osservata in entrambi i gruppi esposti. Questa soppressione, coerente con altri studi su farmaci nei bivalvi (Oliveira et al., 2015), favorisce l'accumulo di perossido di idrogeno e radicali liberi, innescando il danno ossidativo a cascata (Ransy et al., 2020). La risposta del sistema del glutatione è apparsa più complessa e dose-dipendente: a basse concentrazioni si è osservato un aumento bilanciato di GSH e GSSG, indicativo di una risposta compensatoria attiva, mentre a concentrazioni più elevate questo equilibrio è venuto meno, suggerendo un esaurimento delle capacità di difesa.

Le conferme di questo stato di stress sono emerse con forza dall'analisi istologica della ghiandola digestiva. I tessuti hanno mostrato chiare alterazioni atrofiche, con una riduzione dello spessore epiteliale e un allargamento del lume dei tubuli. A questo danno strutturale si è associata una massiccia infiltrazione di emociti, segno di una forte risposta infiammatoria, e la comparsa di "cellule brune" cariche di pigmenti simili alla lipofuscina. La presenza di lipofuscina, un noto biomarcatore di perossidazione lipidica, collega direttamente il danno tissutale osservato allo squilibrio redox misurato a livello biochimico (Cuevas et al., 2015; Pagano et al., 2022).

Infine, l'impatto della clorpromazina si è esteso anche a livello fisiologico, influenzando la produzione del bisso. Si è osservato un interessante compromesso energetico: in risposta al farmaco, gli animali hanno prodotto placche del bisso più lunghe, un probabile adattamento per migliorare l'adesione in condizioni di stress (Aldred et al.,

2006). Tuttavia, questo sforzo morfologico è avvenuto a scapito della quantità, con una drastica diminuzione del numero totale di filamenti prodotti, evidenziando come l'esposizione alla Cpz imponga un costo energetico significativo che compromette le funzioni vitali dell'organismo.

6.9. SLS ed estratto di Bergamotto

Il presente studio è stato disegnato per valutare la capacità dell'estratto di bergamotto (BRG) di mitigare gli effetti tossicologici noti del Laurilsolfato di Sodio (SLS) in *M. galloprovincialis*. L'analisi ha rivelato un quadro complesso, in cui l'efficacia protettiva del BRG varia notevolmente a seconda del livello biologico considerato.

A livello cellulare, l'effetto protettivo del BRG è apparso evidente, in particolare nella ghiandola digestiva (DG). Come previsto, l'SLS da solo ha causato una riduzione significativa della vitalità in questo tessuto metabolicamente attivo. Il risultato cruciale, tuttavia, è stato osservato nel gruppo esposto alla miscela (Mix), dove l'aggiunta di BRG non solo ha annullato la tossicità dell'SLS, ma ha portato la vitalità cellulare a un livello leggermente superiore a quello del controllo. Questo dato fornisce una forte evidenza della capacità del bergamotto di proteggere le cellule da un danno chimico diretto, in linea con il crescente interesse per i composti naturali come agenti citoprotettivi (Banae et al., 2022; Adel et al., 2024).

Questa capacità protettiva è stata ulteriormente esplorata valutando una funzione immunitaria chiave: la fagocitosi. L'SLS ha indotto una severa inibizione della capacità fagocitaria ($p < 0,01$), confermando il suo impatto deleterio sulle difese dell'organismo. L'aggiunta di BRG ha permesso un recupero parziale ma significativo di questa funzione

(fino al 74,32%), dimostrando un'azione di mitigazione anche a livello funzionale, sebbene incompleta.

L'analisi RVD, pur non raggiungendo la significatività statistica, ha fornito indicazioni coerenti: le alterazioni osmotiche indotte dall'SLS apparivano meno marcate nel gruppo Mix, suggerendo un effetto stabilizzante del BRG sull'integrità della membrana cellulare. Tuttavia, questo quadro di protezione cellulare non si è tradotto in un beneficio a livello omeostatico e organismico.

L'analisi degli elettroliti ha rivelato che la combinazione di SLS e BRG non ripristinava l'equilibrio, ma creava un nuovo e complesso profilo ionico, con alterazioni significative nei livelli di cloro, fosforo e magnesio. Questo suggerisce che l'interazione tra i due composti innesca una risposta omeostatica complessa, che va oltre la semplice neutralizzazione del danno.

La discrepanza tra protezione cellulare e costo energetico dell'organismo è emersa in modo inequivocabile dall'analisi della produzione del bisso. Come atteso, l'SLS ha agito da potente stressore, riducendo la produzione di filamenti bissali. Il risultato più sorprendente e significativo è stato però quello del gruppo Mix: nonostante gli effetti benefici osservati a livello cellulare, la combinazione delle due sostanze ha imposto il costo energetico più elevato, portando alla più drastica riduzione nel numero di filamenti prodotti. Questo risultato paradossale indica che il processo di mitigazione della tossicità dell'SLS da parte del bergamotto è energeticamente dispendioso per l'animale, al punto da compromettere funzioni vitali come l'ancoraggio in misura maggiore rispetto all'esposizione al solo tossico.

6.10. CMIT e BPHs

In un contesto di crescente preoccupazione per i contaminanti emergenti, questo studio ha investigato la capacità degli idrolizzati proteici bioattivi (BPHs), derivati da larve di *H. illucens*, di mitigare gli impatti ecotossicologici del biocida CMIT in *M. galloprovincialis*. Sfruttando i principi dell'economia circolare, questi idrolizzati rappresentano una strategia naturale e sostenibile per ripristinare l'omeostasi e la competenza immunitaria in organismi esposti a stress xenobiotico.

I risultati hanno confermato l'impatto tossicologico del CMIT, fornendo al contempo una solida base per validare l'ipotesi dell'effetto protettivo dei BPHs. Come previsto, l'esposizione al solo CMIT ha indotto alterazioni significative, in linea con i noti effetti citotossici degli isotiazolinoni, che compromettono l'integrità della membrana e l'attività metabolica (Garcia-Hidalgo et al., 2018). Fondamentalmente, i gruppi trattati esclusivamente con BPHs non hanno mostrato differenze rispetto ai controlli, dimostrando che questi idrolizzati sono ben tollerati e non inducono tossicità propria. Il dato cruciale è emerso dal co-trattamento (MIX), che ha costantemente portato a un recupero parziale o completo delle funzioni cellulari, indicando un chiaro ruolo mitigante dei BPHs, probabilmente mediato dalle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie dei loro peptidi bioattivi (Riolo et al., 2023; Hoffman et al., 2020).

La vitalità cellulare si è rivelata un indicatore chiave di questo effetto protettivo. La significativa riduzione di vitalità osservata negli emociti e nelle cellule della ghiandola digestiva esposte a CMIT ha confermato il potenziale citotossico del biocida. Tuttavia, la capacità dei BPHs nel gruppo MIX di preservare la vitalità in entrambi i tipi cellulari suggerisce un meccanismo d'azione mirato, che potrebbe implicare la stabilizzazione

della funzione mitocondriale e dell'integrità della membrana, contrastando così i danni specifici indotti dagli isotiazolinoni (Riolo et al., 2023; Zhu et al., 2020).

Questa azione protettiva si è estesa oltre la semplice sopravvivenza cellulare, includendo il ripristino di funzioni fisiologiche essenziali. La capacità di regolare il volume cellulare (RVD), un processo vitale per contrastare gli squilibri osmotici, è risultata significativamente compromessa nel gruppo CMIT, suggerendo un'alterazione dei canali ionici di membrana o della dinamica citoscheletrica (Torre et al., 2013). La completa normalizzazione della risposta RVD nei mitili del gruppo MIX fornisce una forte evidenza dell'effetto stabilizzante dei BPHs sui sistemi di trasporto di membrana e sull'integrità strutturale della cellula.

Analogamente, l'effetto immunosoppressivo del CMIT, manifestatosi con un marcato calo dell'attività fagocitaria degli emociti, è stato efficacemente contrastato dalla presenza dei BPHs. Il recupero di questa funzione critica per la difesa dell'organismo dimostra che l'azione protettiva degli idrolizzati si estende anche alla competenza immunitaria, mitigando uno degli impatti più deleteri degli isotiazolinoni sugli invertebrati marini (Burgos-Aceves & Faggio, 2017).

6.11. Espansione delle analisi a ulteriori contaminanti emergenti o ad organismi alternativi

I risultati ottenuti, pur chiarendo specifici meccanismi di tossicità, evidenziano la necessità di ampliare la prospettiva di indagine per affrontare la complessità degli scenari di contaminazione reale. In quest'ottica, due principali filoni di ricerca appaiono prioritari: lo studio degli effetti di miscele complesse e l'inclusione di organismi modello complementari.

Il primo filone risponde alla necessità di superare l'analisi del singolo contaminante, raramente rappresentativa delle reali condizioni ambientali. Gli ecosistemi acquatici sono infatti esposti a "cocktail" di sostanze chimiche, le cui interazioni possono portare a effetti non prevedibili (sinergici o antagonistici) sulla base della tossicità dei singoli composti. Le indagini future dovrebbero quindi concentrarsi su miscele a concentrazioni ambientalmente rilevanti, includendo classi di composti non trattate in questo studio, come le nanoplastiche, per la loro capacità di veicolare altri inquinanti, o diverse classi di farmaci e fitosanitari, i cui meccanismi d'azione potrebbero interagire a livello di pathway molecolari.

Il secondo filone di ricerca mira ad ampliare la base biologica delle osservazioni. Sebbene i bivalvi come *M. galloprovincialis* siano eccellenti bioindicatori, la valutazione degli impatti su organismi con diverse strategie ecologiche e fisiologiche è fondamentale per una valutazione del rischio a livello di comunità.

- L'inclusione di crostacei (es. *Palaemon serratus*) permetterebbe di valutare endpoint neurotossici e legati al processo della muta.
- L'uso di echinodermi (es. *Paracentrotus lividus*) consentirebbe di studiare la tossicità durante le fasi precoci dello sviluppo, un aspetto critico per la dinamica di popolazione.
- Infine, l'introduzione di un piccolo pesce teleosteo (es. Gobiidae) offrirebbe un modello vertebrato per analizzare alterazioni a carico di sistemi più complessi, come quello endocrino e riproduttivo.

L'integrazione di questi due approcci consentirebbe di definire modelli più robusti dei meccanismi di danno e di sviluppare valutazioni del rischio ecologico con una maggiore capacità predittiva, fornendo strumenti più efficaci per la gestione e la tutela degli ecosistemi acquatici.

CONCLUSIONI

L'incessante immissione di contaminanti emergenti (CE) negli ecosistemi acquatici è una delle eredità più complesse della nostra società. Queste sostanze, onnipresenti in innumerevoli prodotti di uso quotidiano, dai cosmetici ai detersivi, seguono il ciclo dell'acqua fino a raggiungere fiumi e mari, dove interagiscono con il biota in modi che solo ora iniziamo a comprendere appieno. La letteratura scientifica, per quanto in rapida crescita, fatica a tenere il passo con la continua introduzione sul mercato di nuove formulazioni chimiche, lasciando ampie lacune conoscitive sugli effetti a lungo termine di questi composti, soprattutto quando presenti in miscele.

In questo contesto, il presente lavoro di tesi si è sviluppato lungo un duplice binario. Il primo, di natura diagnostica, ha avuto l'obiettivo di caratterizzare il danno indotto da un'ampia e rappresentativa selezione di CE su organismi sentinella marini. Il secondo, di natura propositiva, ha voluto esplorare per la prima volta il potenziale di bioprodotto di origine naturale, derivati da un approccio di economia circolare, come agenti di mitigazione di tale danno. Al di là delle specificità di ciascun composto, è emerso un quadro di effetti ricorrenti, una sorta di "firma tossicologica" condivisa da molte di queste sostanze. L'integrità delle membrane cellulari, la stabilità dei lisosomi e la capacità di regolare il volume cellulare si sono confermati tra i bersagli più precoci e sensibili. In alcuni casi, inoltre, è stata osservata una riduzione della risposta immunitaria, come evidenziato dal calo dell'attività fagocitaria degli emociti, laddove questo parametro è stato indagato.

L'elemento di maggiore novità risiede nell'aver affiancato alla caratterizzazione del danno la validazione sperimentale di strategie di mitigazione. I risultati ottenuti sono

stati estremamente incoraggianti: l'estratto di bergamotto ha dimostrato di poter parzialmente ripristinare la funzionalità cellulare compromessa dal tensioattivo SLS, mentre gli idrolizzati proteici da *H. illucens* hanno mostrato una notevole capacità citoprotettiva nei confronti del biocida CMIT. Questo lavoro rappresenta dunque non solo uno studio scientifico, ma una vera e propria "prova di concetto", che apre la strada a un nuovo paradigma: formulare prodotti di consumo che includano agenti "bioprotettivi" di origine naturale, in grado di ridurre l'impatto ambientale una volta concluso il ciclo di vita del prodotto.

I risultati ottenuti costituiscono una rappresentazione dettagliata, ma necessariamente parziale, di un fenomeno dinamico e molto più complesso. In natura, infatti, gli organismi non sono esposti a un singolo contaminante, bensì a un "cocktail" chimico le cui interazioni restano in larga parte sconosciute. La ricerca futura dovrà quindi affrontare questa complessità, valutando gli effetti di miscele a concentrazioni ambientalmente realistiche. In ultima analisi, questo percorso di ricerca riafferma con forza un principio fondamentale del quadro One Health: la salute dei nostri mari, dei laghi, dei fiumi e degli organismi che li popolano non è un'entità separata, ma è intrinsecamente e indissolubilmente legata alla nostra. One Health è un approccio integrato e unificante che mira a bilanciare in modo sostenibile e ottimizzare la salute dell'uomo, degli animali, delle piante e degli ecosistemi nel loro insieme. Un approccio basato sulla salute è infatti essenziale per prevenire, individuare e controllare le malattie che si diffondono tra gli animali e l'uomo, affrontare la resistenza antimicrobica, garantire la sicurezza alimentare e prevenire le minacce legate all'ambiente. Le molecole che progettiamo per i nostri usi finiscono inevitabilmente nei tessuti di specie che, in molti casi, entrano a far parte della nostra catena alimentare. Comprendere e mitigare il

loro impatto non è quindi solo una questione di conservazione ambientale, ma un atto di responsabilità diretto verso la salute umana e quella delle generazioni future.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Aafaf, E., Abdelfettah, M., Abdesslam, F., Redouane, M., & Abdelali, B. (2017). Adaptation of bivalve molluscs to environmental conditions in the coastal region of El jadida (Morocco): Case of *Mytilus galloprovincialis*. *Eur Sci J*, 13, 226-241.
- Abdel-Latif, H. M., Dawood, M. A., Alagawany, M., Faggio, C., Nowosad, J., & Kucharczyk, D. (2022). Health benefits and potential applications of fucoidan (FCD) extracted from brown seaweeds in aquaculture: An updated review. *Fish & shellfish immunology*, 122, 115-130.
- Abdullah, Z. W., Dong, Y., Davies, I. J., & Barbhuiya, S. (2017). PVA, PVA blends, and their nanocomposites for biodegradable packaging application. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 56(12), 1307-1344.
- Adisasmito, Wiku B., Salama Almuhairi, Casey Barton Behraves, P  p   Bilivogui, Salome A. Bukachi, Natalia Casas, Natalia Cedi  l Becerra et al. "One Health: A new definition for a sustainable and healthy future." *PLoS pathogens* 18, no. 6 (2022): e1010537.
- Aebi, H. (1974). Catalase. In, Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, 67, 3-678.
- Afsa, S., De Marco, G., Giannetto, A., Parrino, V., Cappello, T., ben Mansour, H., & Maisano, M. (2022). Histological endpoints and oxidative stress transcriptional responses in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to realistic doses of salicylic acid. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 92, 103855.

- Aldred, N., Ista, L. K., Callow, M. E., Callow, J. A., Lopez, G. P., & Clare, A. S. (2006). Mussel (*Mytilus edulis*) byssus deposition in response to variations in surface wettability. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(6), 37-43.
- Almeida, Â., Freitas, R., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Soares, A. M., & Figueira, E. (2015). Chronic toxicity of the antiepileptic carbamazepine on the clam *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 172, 26-35.
- Almeida, C., Rijo, P., & Rosado, C. (2020). Bioactive compounds from *Hermetia illucens* larvae as natural ingredients for cosmetic application. *Biomolecules*, 10(7), 976.
- Almroth, B. C., Sturve, J., Stephensen, E., Holth, T. F., & Förlin, L. (2008). Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Marine environmental research*, 66(2), 271-277.
- Alnajar, N., Jha, A. N., & Turner, A. (2021). Impacts of microplastic fibres on the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 262, 128290.
- 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.
- Amantea, D., Fratto, V., Maida, S., Rotiroti, D., Ragusa, S., Nappi, G., ... & Corasaniti, M. T. (2009). Prevention of glutamate accumulation and upregulation of phospho-akt may account for neuroprotection afforded by bergamot essential oil against brain injury induced by focal cerebral ischemia in rat. *International review of neurobiology*, 85, 389-405.

- Amelia, T. S. M., Khalik, W. M. A. W. M., Ong, M. C., Shao, Y. T., Pan, H. J., & Bhubalan, K. (2021). Marine microplastics as vectors of major ocean pollutants and its hazards to the marine ecosystem and humans. *Progress in earth and planetary science*, 8(1), 12.
- An, S., Kuang, Y., Shen, T., Li, J., Ma, H., *et al.* (2013). Brain-targeting delivery for RNAi neuroprotection against cerebral ischemia reperfusion injury. *Biomaterials*, 34(36), 8949–8959. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.057>
- Anderson, R. S. (2001). Reactive oxygen species and antimicrobial defenses of invertebrates: A bivalve model. *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System*, 131-139.
- Andreyeva, A. Y., Lobko, V. V., Gostyukhina, O. L., Tkachuk, A. A., Murashova, A. I., Malakhova, L. V., & Kladchenko, E. S. (2023). Accumulation, functional and antioxidant responses to acute exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin*, 191, 114923.
- Arnold, W. A., Blum, A., Branyan, J., Bruton, T. A., Carignan, C. C., Cortopassi, G., ... & 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.
- 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*, 9(1), 100205.

- Aslam, M., Kalyar, M. A., & Raza, Z. A. (2018). Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol-based nanocomposites. *Polymer Engineering & Science*, 58(12), 2119-2132.
- Ateia, M., Zheng, T., Calace, S., Tharayil, N., Pilla, S., & Karanfil, T. (2020). Sorption behavior of real microplastics (MPs): insights for organic micropollutants adsorption on a large set of well-characterized MPs. *Science of the Total Environment*, 720, 137634.
- 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.
- Aypa, S. M. (1990). Mussel culture. *Selected papers on mollusc culture*. <http://www.fao.org/3/ab737e/AB737E04.Htm#ch4>.
- Bagetta, G., Morrone, L. A., Rombolà, L., Amantea, D., Russo, R., Berliocchi, L., ... & Corasaniti, M. T. (2010). Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*, 81(6), 453-461
- Bai, M. Y., & Liu, S. Z. (2014). A simple and general method for preparing antibody-PEG-PLGA sub-micron particles using electrospray technique: An in vitro study of targeted delivery of cisplatin to ovarian cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.031>
- Bai, Y., Chen, Y., Wang, Q., & Wang, T. (2014). Poly (vinyl butyral) based polymer networks with dual-responsive shape memory and self-healing properties. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(24), 9169-9177.
- Bailey, G. (1975). *The role of shell middens in prehistoric economies* (Doctoral dissertation, Department of Archaeology).

- Baker, D. W., Zhou, J., Tsai, Y. T., Patty, K. M., Weng, H., *et al.* (2014). Development of optical probes for in vivo imaging of polarized macrophages during foreign body reactions. *Acta Biomaterialia*, 10(7), 2945–2955. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.040>
- 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.
- 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.
- Barbosa, M. O., Moreira, N. F., Ribeiro, A. R., Pereira, M. F., & Silva, A. M. (2016). Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water research*, 94, 257-279.
- Barmo, C., Ciacci, C., Canonico, B., Fabbri, R., Cortese, K., Balbi, T., ... & 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.
- Barndök, H., Cortijo, L., Hermosilla, D., Negro, C., & Blanco, Á. (2014). Removal of 1, 4-dioxane from industrial wastewaters: routes of decomposition under different operational conditions to determine the ozone oxidation capacity. *Journal of Hazardous Materials*, 280, 340-347.
- Barragán-Fonseca, K., Pineda-Mejia, J., Dicke, M., & Van Loon, J. J. (2018). Performance of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) on vegetable

residue-based diets formulated based on protein and carbohydrate contents. *Journal of economic entomology*, 111(6), 2676-2683.

- Barrowclough, D., & Deere Birkbeck, C. (2020). Transforming the global plastics economy: the political economy and governance of plastics production and pollution (No. 142). GEG Working Paper.
- Bartosz, G. (2013). Food oxidants and antioxidants: Chemical, biological, and functional properties. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b15433>
- Batir, E., Aydin, I., Theodorou, J. A., & Rakaj, A. (2025). *Mytilus galloprovincialis*'s role in Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA): A comprehensive review. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 56(2).
- Beiras, R., & Schönemann, A. M. (2020). Currently monitored microplastics pose negligible ecological risk to the global ocean. *Scientific reports*, 10(1), 22281.
- Bellas, J., Martínez-Armental, J., Martínez-Cámara, A., Besada, V., & Martínez-Gómez, C. (2016). Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. *Marine pollution bulletin*, 109(1), 55-60.
- Beltifa, A., Feriani, A., Machreki, M., Ghorbel, A., Ghazouani, L., Di Bella, G., ... & Mansour, H. B. (2017). Plasticizers and bisphenol A, in packaged foods sold in the Tunisian markets: study of their acute in vivo toxicity and their environmental fate. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(28), 22382-22392.
- Bhattacharya, S. (2018). The role of medicinal plants and natural products in melioration of cadmium toxicity. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(3), 177-186.
- Biel-Maeso, M., Baena-Nogueras, R. M., Corada-Fernández, C., & Lara-Martín, P. A. (2018). Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically

active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Science of the Total Environment*, 612, 649-659.

- Bjørklund, G., Rahaman, M. S., Shanaida, M., Lysiuk, R., Oliynyk, P., Lenchyk, L., ... & Peana, M. (2022). Natural dietary compounds in the treatment of arsenic toxicity. *Molecules*, 27(15), 4871.
- Bollmann, U. E., Fernández-Calviño, D., Brandt, K. K., Storgaard, M. S., Sanderson, H., & Bester, K. (2017). Biocide runoff from building facades: Degradation kinetics in soil. *Environmental science & technology*, 51(7), 3694-3702.
- Bouallegui, Y., Ben Younes, R., Bellamine, H., & Oueslati, R. (2017). Histopathology and analyses of inflammation intensity in the gills of mussels exposed to silver nanoparticles: role of nanoparticle size, exposure time, and uptake pathways. *Toxicology mechanisms and methods*, 27(8), 582-591.
- Boujemaa-Paterski, R., Galland, R., Suarez, C., Guérin, C., Théry, M., *et al.* (2014). Directed actin assembly and motility. In *Methods in Enzymology*, 540 (pp. 283–300). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417162-6.00016-0>
- Bråte, I. L. N., Blázquez, M., Brooks, S. J., & Thomas, K. V. (2018). Weathering impacts the uptake of polyethylene microparticles from toothpaste in Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*). *Science of the Total Environment*, 626, 1310-1318.
- Brausch, J. M., & Rand, G. M. (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82(11), 1518-1532.
- Bregnbak, D., Lundov, M. D., Zachariae, C., Menné, T., & Johansen, J. D. (2013). Five cases of severe chronic dermatitis caused by isothiazolinones. *Contact Dermatitis* (01051873), 69(1).

- Broséus, R., Vincent, S., Aboulfadl, K., Daneshvar, A., Sauvé, S., Barbeau, B., & Prévost, M. (2009). Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. *Water research*, 43(18), 4707-4717.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental science & technology*, 42(13), 5026-5031.
- 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.
- Bui, T. T., Giovanoulis, G., Cousins, A. P., Magnér, J., Cousins, I. T., & de Wit, C. A. (2016). Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. *Science of the total environment*, 541, 451-467.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126426>
- Burgos-Aceves, M. A., Cohen, A., Paoletta, G., Lepretti, M., Smith, Y., Faggio, C., et al. (2018). Modulation of mitochondrial functions by xenobiotic-induced microRNA: From environmental sentinel organisms to mammals. *Science of the Total Environment*, 645, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.075>

- Burgos-Aceves, M. A., Cohen, A., Smith, Y., & Faggio, C. (2018). A potential microRNA regulation of immune-related genes in invertebrate haemocytes. *Science of the Total Environment*, 621, 302-307.
- Cadinu, L. A., Barra, P., Torre, F., Delogu, F., & Madau, F. A. (2020). Insect rearing: Potential, challenges, and circularity. *Sustainability*, 12(11), 4567.
- Calabrese, C., Arduini, D., Portacci, G., Quarta, E., Giangrande, A., Acquaviva, M. I., ... & Stabili, L. Farming Strategy Under Climate Change: Growth Performances and Quality of *Mytilus Galloprovincialis* in an Imta System (Mediterranean Sea). Available at SSRN 5258768.
- Calabrese, E. J. (2008). Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1451-1474.
- Canesi, L., Lorusso, L. C., Ciacci, C., Betti, M., Regoli, F., Poiana, G., ... & Marcomini, A. (2007). Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 69(6), 994-1002.
- Capolupo, M., Gunaalan, K., Booth, A. M., Sørensen, L., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2021). The sub-lethal impact of plastic and tire rubber leachates on the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, 283, 117081.
- Carella, F., Aceto, S., Pollaro, F., Miccio, A., Iaria, C., Carrasco, N., ... & De Vico, G. (2019). A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy. *Scientific reports*, 9(1), 2725.
- Carvalho, T. L. A. D. B., Nascimento, A. A. D., Gonçalves, C. F. D. S., Santos, M. A. J. D., & Sales, A. (2020). Assessing the histological changes in fish gills as

- environmental bioindicators in Paraty and Sepetiba bays in Rio de Janeiro, Brazil. *Latin american journal of aquatic research*, 48(4), 590-601.
- Castro, P., & Huber, M. E. (2011). *Marine biology* (R. Sandulli, G. Giaccone, & A. Tursi, Eds.). Milano, Italy: The McGraw-Hill Companies, S.r.l.
 - Celi, P., & Gabai, G. (2015). Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 48. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00048>
 - Cencer, M., Liu, Y., Winter, A., Murley, M., Meng, H., *et al.* (2014). Effect of pH on the rate of curing and bioadhesive properties of dopamine functionalized poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biomacromolecules*, 15(8), 2861–2869. <https://doi.org/10.1021/bm500672h>
 - Chaturvedi, V., & Kumar, A. (2010). Toxicity of sodium dodecyl sulfate in fishes and animals a review.
 - Chen, J., Shi, M., Liu, P., Ko, A., Zhong, W., *et al.* (2014). Reducible polyamidoamine-magnetic iron oxide self-assembled nanoparticles for doxorubicin delivery. *Biomaterials*, 35(5), 1240–1248. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.070>
 - Choi, J. S., Kim, K., Hong, S. H., Park, K. I., & Park, J. W. (2021). Impact of polyethylene terephthalate microfiber length on cellular responses in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 168, 105320.
 - Chong, Y., Ma, Y., Shen, H., Tu, X., Zhou, X., *et al.* (2014). The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. *Biomaterials*, 35(17), 5041–5048. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.034>

- Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of dairy science*, 83(6), 1187-1195.
- Collier, P. J., Ramsey, A. J., Austin, P., & Gilbert, P. (1990b). Growth inhibitory and biocidal activity of some isothiazolone biocides. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(4), 569-577.
- Collier, P. J., Ramsey, A., Waigh, R. D., Douglas, K. T., Austin, P., & Gilbert, P. (1990a). Chemical reactivity of some isothiazolone biocides. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(4), 578-584.
- Commission Regulation (EU) 2017/893 of 24 May 2017 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council and Annexes X, XIV and XV to Commission Regulation (EU) No 142/2011 as regards the provisions on processed animal protein (Text with EEA relevance). (2017). Retrieved January 1, 2021, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0893>
- Cannon, R. E., Geist, J., & Werner, I. (2012). Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors*, 12(9), 12741-12771.
- Cruz, D., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Wrona, F. J., ... & Freitas, R. (2016). Caffeine impacts in the clam *Ruditapes philippinarum*: Alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. *Chemosphere*, 160, 95-103.
- 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.
- 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.
- D'Amico, R., Monaco, F., Fusco, R., Peritore, A. F., Genovese, T., Impellizzeri, D., ... & Di Paola, R. (2021). Exposure to atrazine induces lung inflammation through Nrf2-HO1 and Beclin 1/LC3 pathways. *Cell Physiol Biochem*, 55(4), 413-427.
- 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.
- de Andrade, H. N., de Oliveira, J. F., Siniscalchi, L. A. B., da Costa, J. D., & Fia, R. (2024). Global insight into the occurrence, treatment technologies and ecological risk of emerging contaminants in sanitary sewers: Effects of the SARS-CoV-2 coronavirus pandemic. *Science of The Total Environment*, 921, 171075.
- De Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 55-62.

- De Groot, A. C., & Coenraads, P. J. (2010). Twenty-five years quaternium-15 in the European baseline series: does it deserve its place there?. *Contact Dermatitis*, 62(4), 210-220.
- De Marco, G., Afsa, S., Galati, M., Billè, B., Parrino, V., Ben Mansour, H., & Cappello, T. (2022). Comparison of cellular mechanisms induced by pharmaceutical exposure to caffeine and its combination with salicylic acid in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 93, 103888.
- De Sá, L. C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T. L., & Futter, M. N. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: what do we know and where should we focus our efforts in the future?. *Science of the total environment*, 645, 1029-1039.
- Debnath, R., Prasad, G. S., Amin, A., Malik, M. M., Ahmad, I., Abubakr, A., ... & Faggio, C. (2024). Understanding and addressing microplastic pollution: Impacts, mitigation, and future perspectives. *Journal of Contaminant Hydrology*, 266, 104399.
- Della Croce, N., Cattaneo Vietti, R., & Danovaro, R. (1997). *Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero* (pp. 1-426). UTET Libreria Università.
- Della Torre, C., Balbi, T., Grassi, G., Frenzilli, G., Bernardeschi, M., Smerilli, A., ... & Corsi, I. (2015). Titanium dioxide nanoparticles modulate the toxicological response to cadmium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of hazardous materials*, 297, 92-100.
- DeMerlis, C. C., & Schoneker, D. R. (2003). Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and chemical Toxicology*, 41(3), 319-326.
- Diener, S., Zurbrügg, C., & Tockner, K. (2009). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Management*

- Research: Journal of the International Solid Waste Association*, 27(6), 603–610.
<https://doi.org/10.1177/0734242X09343027>
- Dudley, K., Liu, X., & De Haan, S. (2017). Chlorpromazine dose for people with schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4).
 - 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.
 - ECPI – European Council for Plasticisers and Intermediates. (2018). *Plasticisers and flexible PVC*. https://fww.plasticisers.org/wp-content/uploads/2018/10/ECPI_proposal_V19b_15022016.pdf
 - ECPI – European Council for Plasticisers and Intermediates. (2019). *Focus on plasticisers*. https://fww.plasticisers.org/wp-content/uploads/2019/01/PLASTICISERS_LEAFLET_UPDATE_15012019_for_REPRINT_2019.pdf
 - Eggermont, M. (2017). *Toolbox development to study host-pathogen interactions in the blue mussel *Mytilus edulis** (Doctoral dissertation, Ghent University).
 - Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441.
 - Epa, E. (2009). Reregistration eligibility decision (RED) for malathion. *Washington, DC: United States Environmental Protection Agency*.
 - Ericson, H., Thorsén, G., & Kumblad, L. (2010). Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 223-231.
 - Escudero, J., Muñoz, J. L., Morera-Herreras, T., Hernandez, R., Medrano, J., Domingo-Echaburu, S., ... & Lertxundi, U. (2021). Antipsychotics as

environmental pollutants: An underrated threat?. *Science of the Total Environment*, 769, 144634.

- European Commission. (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union*, L396, 1–849. https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/12550-Harmful-chemicals-updated-list-of-endocrine-disrupting-substances-REACH-Regulation-_en
- European Commission. (2007). Commission Directive 2007/19/EC of 2 April 2007 amending Directive 2002/72/EC relating to plastic materials and articles intended to come into contact with food and Council Directive 85/572/EEC laying down the list of simulants to be used for testing migration of constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L97, 50.
- European Parliament and Council. Regulation (EC) No 1272/2008 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.
- Fabbri, E., & Franzellitti, S. (2016). Human pharmaceuticals in the marine environment: focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(4), 799-812.

- 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.
- FAO, WHO, & OIE. (2008). *Contributing to One World, One Health: A Strategic Framework for Reducing Risks of Infectious Diseases at the Animal–Human–Ecosystems Interface*.
- 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.
- Figueras, A., & Novoa, B. (2011). Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en Acuicultura.
- 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 *Scyliorhinus canicula* from the Central Tyrrhenian Sea. *Antioxidants*, 12(2), 524.
- Finke, M. D. (2013). Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo Biology*, 32(1), 27–36.

- Firmansyah, M., & Abduh, M. Y. (2019). Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from *Hermetia illucens*. *Heliyon*, 5(11), e02005. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02005>
- Firmansyah, M., & Abduh, M. Y. (2019). Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from *Hermetia illucens*. *Heliyon*, 5(6).
- Fisher, K., & Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of applied microbiology*, 101(6), 1232-1240.
- Flyvholm, M. A. (1991). Contact allergens in registered chemical products. *Contact Dermatitis*, 25(1), 49-56.
- Fočak, M., Džafić, S., & Suljević, D. (2019). Electrolytes and heavy metals in coelomic fluid of sea urchin, *Arbacia lixula* from Adriatic sea: biochemical approach to ecotoxicological study. *NAŠE MORE: znanstveni časopis za more i pomorstvo*, 66(2), 51-56.
- Forlot, P., & Pevet, P. (2012). Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) essential oil: Biological properties, cosmetic and medical use. A review. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2), 195-201.
- Frédéric, O., & Yves, P. (2014). Pharmaceuticals in hospital wastewater: their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*, 115, 31-39.
- Freitas, R., Coppola, F., Costa, S., Manzini, C., Intorre, L., Meucci, V., ... & Solé, M. (2019). Does salinity modulates the response of *Mytilus galloprovincialis* exposed to triclosan and diclofenac?. *Environmental Pollution*, 251, 756-765.

- Fried, R. (1975). Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. *Biochimie*, 57(5), 657-660.
- 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.
- Gajbhiye, V., Escalante, L., Chen, G., Laperle, A., Zheng, Q., *et al.* (2014). Drug-loaded nanoparticles induce gene expression in human pluripotent stem cell derivatives. *Nanoscale*, 6(2), 521–531. <https://doi.org/10.1039/c3nr04956g>
- Gallegos, M. E. H., Zannatha, M. M. I., Osornio, E. G., Sánchez, A. S., & del Rio, F. A. P. (1999). The activities of six exo- and endopeptidases in the substantia nigra, neostriatum, and cortex of the rat brain. *Neurochemical Research*, 24(12), 1557–1561.
- 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.
- Gasco, L., Biancarosa, I., & Liland, N. S. (2020). From waste to feed: A review of recent knowledge on insects as producers of protein and fat for animal feeds. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 23, 67–79.
- Gewert, B., Plassmann, M. M., & MacLeod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental science: processes & impacts*, 17(9), 1513-1521.
- Gheldof, N., & Engeseth, N. J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3050-3055.

- Giannetto, A., Oliva, S., Riolo, K., Savastano, D., Parrino, V., Cappello, T., Maisano, M., Fasulo, S., & Mauceri, A. (2020). Waste valorization via *Hermetia illucens* to produce protein-rich biomass for feed: Insight into the critical nutrient taurine. *Animals*, 10(10), 1710. <https://doi.org/10.3390/ani10101710>
- Giantsis, I. A., Mucci, N., Randi, E., Abatzopoulos, T. J., & Apostolidis, A. P. (2014). Microsatellite variation of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in central and eastern Mediterranean: genetic panmixia in the Aegean and the Ionian Seas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94(4), 797-809.
- Giordano, L., Portacci, G., & Caroppo, C. (2019). Multidisciplinary tools for sustainable management of an ecosystem service: The case study of mussel farming in the Mar Piccolo of Taranto (Mediterranean, Ionian Sea). *Ocean & Coastal Management*, 176, 11-23.
- Gómez-Mendikute, A., Elizondo, M., Venier, P., & Cajaraville, M. P. (2005). Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro. *Cell and Tissue Research*, 321(1), 131-140.
- González-Soto, N., Hatfield, J., Katsumiti, A., Duroudier, N., Lacave, J. M., Bilbao, E., ... & Cajaraville, M. P. (2019). Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo [a] pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, 684, 548-566.
- Gostyukhina, O. L., Andreyeva, A. Y., Chelebieva, E. S., Vodiasova, E. A., Lantushenko, A. O., & Kladchenko, E. S. (2022). Adaptive potential of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* to short-term environmental hypoxia. *Fish & Shellfish Immunology*, 131, 654-661.

- Gozlan, R. E., Bommarito, C., Caballero-Huertas, M., Givens, J., Mortillaro, J. M., Pepey, E., ... & Combe, M. (2024). A one-health approach to non-native species, aquaculture, and food security. *Water Biology and Security*, 3(2), 100250.
- Halima, N. B. (2016). Poly (vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. *RSC advances*, 6(46), 39823-39832.
- Han, Y., Gu, X., Lin, C., He, M., & Wang, Y. (2024). Effects of COVID-19 on coastal and marine environments: aggravated microplastic pollution, improved air quality, and future perspective. *Chemosphere*, 355, 141900.
- Hanboonsong, Y. (2010). Edible insects and associated food habits in Thailand. *Forest insects as food: humans bite back*, 173, 182.
- Hao, Y., Shih, H., Munoz, Z., Kemp, A., & Lin, C. C. (2014). Visible light cured thiol-vinyl hydrogels with tunable degradation for 3D cell culture. *Acta Biomaterialia*, 10(1), 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.004>
- Hassan, C. M., & Peppas, N. A. (2000). Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. In *Biopolymers: PVA hydrogels, anionic polymerisation nanocomposites* (pp. 37-65). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- 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.
- Hauthal, H. G. (1992). Trends in surfactants. *Chimica oggi*, 10(5), 9-13.
- Hoehlig, K., Maasch, C., Shushakova, N., Buchner, K., Huber-Lang, M., *et al.* (2013). A novel C5a-neutralizing mirror-image (l-)aptamer prevents organ failure and improves survival in experimental sepsis. *Molecular Therapy*, 21(11), 2236–2246. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.180>

- Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., & Pedersen, S. F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiological Reviews*, 89(1), 193-277.
- Hou, B., Li, S., Li, X., & Xiu, Z. (2007). Design, preparation and in vitro bioactivity of mono-PEGylated recombinant hirudin. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15(5), 775–780. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(07\)60164-7](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(07)60164-7)
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., & Wu, G. (2022). Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Bioactive Peptides from Food*, 209-232.
- Hough, C. (2022). Regional review on status and trends in aquaculture development in Europe–2020. *Food & Agriculture Org.*
- <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-ofplastics-since-0000/>; Accessed April 20, 2024.
- 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, W., Li, Y., Wang, F., Feng, L., Wang, D., Ma, Y., ... & Luo, J. (2023). Disinfectant sodium dichloroisocyanurate synergistically strengthened sludge acidogenic process and pathogens inactivation: Targeted upregulation of functional microorganisms and metabolic traits via self-adaptation. *Water Research*, 247, 120787.
- Hutanu, D., & Darie, C. C. (2014). Trends in characterization of PEGylated proteins by mass spectrometry. *Modern Chemistry Applications*, 2, 132. <https://doi.org/10.4172/2329-6798.1000132>

- Impellitteri, F., Briglia, M., Porcino, C., Stoliar, O., Yunko, K., Germanà, A., ... & Guerrera, M. C. (2024c). The odd couple: Caffeine and microplastics. Morphological and physiological changes in *Mytilus galloprovincialis*. *Microscopy Research and Technique*, 87(5), 1092-1110.
- Impellitteri, F., Curpăn, A. S., Plăvan, G., Ciobica, A., & Faggio, C. (2022). Hemocytes: a useful tool for assessing the toxicity of microplastics, heavy metals, and pesticides on aquatic invertebrates. *International journal of environmental research and public health*, 19(24), 16830.
- Impellitteri, F., Multisanti, C. R., Di Paola, D., Inferrera, F., Cuzzocrea, S., Banaee, M., ... & Cordaro, M. (2025b). A Comparative Analysis of Physiological and Morphological Alteration in *Mytilus galloprovincialis* After Exposure to Polyethylene Glycol (PEG). *Microscopy Research and Technique*, 88:2222–2231.
- Impellitteri, F., Multisanti, C. R., Riolo, K., Zicarelli, G., Porretti, M., Cafeo, G., ... & Faggio, C. (2025c). Bergamot (*Citrus bergamia*): a potential new nutraceutical against cellular and physiological alterations induced by emerging contaminants in sentinel organisms. *Antioxidants*, 14(5), 539.
- Impellitteri, F., Multisanti, C. R., Rusanova, P., Piccione, G., Falco, F., & Faggio, C. (2023c). Exploring the impact of contaminants of emerging concern on fish and invertebrates' physiology in the Mediterranean Sea. *Biology*, 12(6), 767.
- 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., ... & Faggio, C. (2025a). Evaluation of cellular and physiological alterations of cells

from *Mytilus galloprovincialis* exposed to benzisothiazolinone. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 290, 117631.

- Impellitteri, F., Yunko, K., Calabrese, G., Porretti, M., Martyniuk, V., Gnatyshyna, L., ... & Faggio, C. (2024b). Chlorpromazine's impact on *Mytilus galloprovincialis*: a multi-faceted investigation. *Chemosphere*, 350, 141079.
- Impellitteri, F., Yunko, K., Martyniuk, V., Khoma, V., Piccione, G., Stoliar, O., & Faggio, C. (2023a). Cellular and oxidative stress responses of *Mytilus galloprovincialis* to chlorpromazine: implications of an antipsychotic drug exposure study. *Frontiers in Physiology*, 14, 1267953.
- Impellitteri, F., Yunko, K., Martyniuk, V., Matskiv, T., Lechachenko, S., Khoma, V., ... & Faggio, C. (2023b). Physiological and biochemical responses to caffeine and microplastics in *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, 890, 164075.
- Impellizzeri, D., Bruschetta, G., Di Paola, R., Ahmad, A., Campolo, M., Cuzzocrea, S., ... & Navarra, M. (2015). The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition*, 34(6), 1146-1154.
- Itoh, H., Li, Y., Chan, K. H. K., & Kotaki, M. (2016). Morphology and mechanical properties of PVA nanofibers spun by free surface electrospinning. *Polymer Bulletin*, 73(10), 2761-2777.
- Jebara, A., Albergamo, A., Rando, R., Potortì, A. G., Turco, V. L., Mansour, H. B., & Di Bella, G. (2021). Phthalates and non-phthalate plasticizers in Tunisian marine samples: Occurrence, spatial distribution and seasonal variation. *Marine Pollution Bulletin*, 163, 111967.

- Jin, M., Chen, W., Huang, W., Rong, L., & Gao, Z. (2013). Preparation of pegylated lumbrokinase and an evaluation of its thrombolytic activity both in vitro and in vivo. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(2), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.02.004>
- Jindal, R., Sharma, R., Kaur, P., Kaur, S., Multisanti, C. R., & Faggio, C. (2024). Mitigation of haemato-genotoxic and stress response effects in *Cyprinus carpio* via silymarin dietary supplementation following deltamethrin exposure. *Heliyon*, 10(7).
- Johnson, A. C., Dumont, E., Williams, R. J., Oldenkamp, R., Cisowska, I., & Sumpter, J. P. (2013). Do concentrations of ethinylestradiol, estradiol, and diclofenac in European rivers exceed proposed EU environmental quality standards?. *Environmental science & technology*, 47(21), 12297-12304.
- Johnston, G. A. (2014). The rise in prevalence of contact allergy to methylisothiazolinone in the British Isles. *Contact Dermatitis (01051873)*, 70(4).
- Jucker, C., Erba, D., Leonardi, M. G., Lupi, D., & Savoldelli, S. (2017). Assessment of vegetable and fruit substrates as potential rearing media for *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Environmental Entomology*, 46(6), 1415–1423.
- Kalová, M., & Borkovcová, M. (2013). Voracious larvae *Hermetia illucens* and treatment of selected types of biodegradable waste. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 61(1), 77–83.
- Kang, P., Suh, S. H., Min, S. S., & Seol, G. H. (2013). The essential oil of *Citrus bergamia* Risso induces vasorelaxation of the mouse aorta by activating K⁺ channels and inhibiting Ca²⁺ influx. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(5), 745-749.

- Kang, T., Gao, X., Hu, Q., Jiang, D., Feng, X., *et al.* (2014). iNGR-modified PEG-PLGA nanoparticles that recognize tumor vasculature and penetrate gliomas. *Biomaterials*, 35(15), 4319–4332. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.003>
- Karaca, M., Özbek, H., Him, A., Tütüncü, M., Akkan, H. A., & Kaplanoğlu, V. (2007). Investigation of anti-inflammatory activity of bergamot oil. *European Journal of General Medicine*, 4(4), 176-179.
- Karbalaei, S., Hanachi, P., Walker, T. R., & Cole, M. (2018). Occurrence, sources, human health impacts and mitigation of microplastic pollution. *Environmental science and pollution research*, 25(36), 36046-36063.
- Kheirabadi, E. P., Shekarabi, P. H., Yadollahi, F., Soltani, M., Najafi, E., von Hellens, J., ... & Faggio, C. (2022). Red yeast (*Phaffia rhodozyma*) and its effect on growth, antioxidant activity and color pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Reports*, 23, 101082.
- Kim, D., Kim, E. H., & Bae, O. N. (2021). Comparative study of two isothiazolinone biocides, 1, 2-benzisothiazolin-3-one (BIT) and 4, 5-dichloro-2-n-octyl-isothiazolin-3-one (DCOIT), on barrier function and mitochondrial bioenergetics using murine brain endothelial cell line (bEND. 3). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 84(22), 932-943.
- Kim, K. S., Park, W., Hu, J., Bae, Y. H., & Na, K. (2014). A cancer-recognizable MRI contrast agent using pH-responsive polymeric micelle. *Biomaterials*, 35(1), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.084>
- Kim, M. K., Kim, K. B., Lee, J. Y., Kwack, S. J., Kwon, Y. C., Kang, J. S., ... & Lee, B. M. (2019). Risk assessment of 5-chloro-2-methylisothiazol-3 (2H)-one/2-methylisothiazol-3 (2H)-one (CMIT/MIT) used as a preservative in cosmetics. *Toxicological Research*, 35(2), 103-117.

- Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Marić, J. J., Djordjević, J., Vuković-Gačić, B., Joksimović, D., ... & Ramšak, A. (2023). Single and combined potential of polystyrene microparticles and fluoranthene in the induction of DNA damage in haemocytes of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Mutagenesis*, 38(1), 3-12.
- Kong, X., Yu, K., Yu, M., Feng, Y., Wang, J., *et al.* (2014). A novel multifunctional poly(amidoamine) dendrimeric delivery system with superior encapsulation capacity for targeted delivery of the chemotherapy drug 10-hydroxycamptothecin. *International Journal of Pharmaceutics*, 465(1–2), 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.034>
- Kroeker, K. J., Gaylord, B., Hill, T. M., Hosfelt, J. D., Miller, S. H., & Sanford, E. (2014). The role of temperature in determining species' vulnerability to ocean acidification: a case study using *Mytilus galloprovincialis*. *PloS one*, 9(7), e100353.
- Kumar, D., Jat, S. K., Khanna, P. K., Vijayan, N., & Banerjee, S. (2012). Synthesis, characterization, and studies of PVA/Co-doped ZnO nanocomposite films. *International Journal of Green Nanotechnology*, 4(3), 408-416.
- 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.
- Ladhar-Chaabouni, R., & Hamza-Chaffai, A. (2016). The cell cultures and the use of haemocytes from marine molluscs for ecotoxicology assessment. *Cytotechnology*, 68(5), 1669-1685.
- Lamiot, November 4, 2006, Wikimedia Commons.

- Langford, B. J., So, M., Raybardhan, S., Leung, V., Soucy, J. P. R., Westwood, D., ... & MacFadden, D. R. (2021). Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. *Clinical microbiology and infection*, 27(4), 520-531.
- 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.
- Latheef, F., & Wilkinson, S. M. (2015). Methylisothiazolinone outbreak in the European Union. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 15(5), 461-46
- Lee, W. Y., Lee, W. T., Cheng, C. H., Chen, K. C., Chou, C. M., Chung, C. H., ... & Lin, C. W. (2015). Repositioning antipsychotic chlorpromazine for treating colorectal cancer by inhibiting sirtuin 1. *Oncotarget*, 6(29), 27580.
- 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., ... & 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, H., Zhang, W., Xu, W., & Zhang, X. (2000). Hydrogen bonding governs the elastic properties of poly (vinyl alcohol) in water: single-molecule force spectroscopic studies of PVA by AFM. *Macromolecules*, 33(2), 465-469.
- Li, P., & Wu, G. (2020). Composition of amino acids and related nitrogenous nutrients in feedstuffs for animal diets. *Amino Acids*, 52, 1-20.
- Limonta, G., Panti, C., Fossi, M. C., Nardi, F., & Baini, M. (2024). Exposure to virgin and marine incubated microparticles of biodegradable and conventional

- polymers modulates the hepatopancreas transcriptome of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Hazardous Materials*, 468, 133819.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., & Schettino, T. (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, 46(3), 324-330.
 - Liu, B., Chen, W., Evavold, B. D., & Zhu, C. (2014). Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers T cell signaling. *Cell*, 157(2), 357–368. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.062>
 - Lorenzo, M., Campo, J., & Picó, Y. (2018). Analytical challenges to determine emerging persistent organic pollutants in aquatic ecosystems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 103, 137-155.
 - 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.
 - Lv, C., Hou, J., Xie, W., & Cheng, H. (2015). Investigation on formaldehyde release from preservatives in cosmetics. *International journal of cosmetic science*, 37(5), 474-478.
 - Mackay, D., & Barnthouse, L. (2010). Integrated risk assessment of household chemicals and consumer products: Addressing concerns about triclosan. *Integrated environmental assessment and management*, 6(3), 390-392.
 - Mackenzie, John S., and Martyn Jeggo. "The one health approach—why is it so important?." *Tropical medicine and infectious disease* 4, no. 2 (2019): 88.

- Madau, F. A., Arru, B., Furesi, R., & Pulina, P. (2020). Insect farming for feed and food production from a circular business model perspective. *Sustainability*, 12(14), 5418.
- Mahanta, N., & Valiyaveetil, S. (2011). Surface modified electrospun poly (vinyl alcohol) membranes for extracting nanoparticles from water. *Nanoscale*, 3(11), 4625-4631.
- Maienfisch, P., & Edmunds, A. J. (2017). Thiazole and isothiazole ring-containing compounds in crop protection. *Advances in heterocyclic chemistry*, 121, 35-88.
- Maitz, M. F., Freudenberg, U., Tsurkan, M. V., Fischer, M., Beyrich, T., *et al.* (2013). Bioresponsive polymer hydrogels homeostatically regulate blood coagulation. *Nature Communications*, 4, 2168. <https://doi.org/10.1038/ncomms3168>
- Makkar, H. P. S., Tran, G., Heuzé, V., & Ankers, P. (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 197, 1–33.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., & Leboulenger, F. (2005). The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, 2(2), 91-104.
- Mangano, M. C., Corbari, L., Giacoletti, A., Berlino, M., Kay, S., Ciraolo, G., & Sarà, G. (2023). Planning precision aquaculture activities in a changing and crowded sea. *Aquaculture*, 577, 739881
- Mankidy, R., Wiseman, S., Ma, H., & Giesy, J. P. (2013). Biological impact of phthalates. *Toxicology letters*, 217(1), 50-58.
- Marín Cardona, E. S., Rojas Camargo, J. J., & Ciro Monsalve, Y. A. (2014). A review of polyvinyl alcohol derivatives: promising materials for pharmaceutical & biomedical applications.

- 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., ... & 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.
- Marone, P. A. (2016). Food safety and regulatory concerns. In A. T. Dossey, J. Morales-Ramos, & M. G. Rojas (Eds.), *Insects as sustainable food ingredients* (pp. 203–221). Academic Press.
- Marteinson, S. C., Lawrence, M. J., Taranu, Z. E., Kosziwka, K., Taylor, J. J., Green, A., ... & Cooke, S. J. (2022). Increased use of sanitizers and disinfectants during the COVID-19 pandemic: identification of antimicrobial chemicals and considerations for aquatic environmental contamination. *Environmental Reviews*, 31(1), 76-94.
- Martyniuk, V., Khoma, V., Matskiv, T., Baranovsky, V., Orlova-Hudim, K., Gylytė, B., ... & Stoliar, O. (2022). Indication of the impact of environmental stress on the responses of the bivalve mollusk *Unio tumidus* to ibuprofen and microplastics based on biomarkers of reductive stress and apoptosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 261, 109425.
- Martyniuk, V., Khoma, V., Matskiv, T., Yunko, K., Gnatyshyna, L., Stoliar, O., & Faggio, C. (2023). Combined effect of microplastic, salinomycin and heating on *Unio tumidus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 98, 104068.
- 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.

- Mather, J. A. (2019). Ethics and care: For animals, not just mammals. *Animals*, 9(12), 1018.
- May, R. C., & Machesky, L. M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*, 114(6), 1061-1077.
- Mei, L., Fu, L., Shi, K., Zhang, Q., Liu, Y., et al. (2014). Increased tumor targeted delivery using a multistage liposome system functionalized with RGD, TAT and cleavable PEG. *International Journal of Pharmaceutics*, 468(1–2), 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.014>
- Mejillón De Galicia. (2023). Historical tradition. Retrieved October 15, 2023, from https://www.mexillondeg Galicia.org/?page_id=148
- 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.
- Miglietta, P. P., De Leo, F., Ruberti, M., & Massari, S. (2015). Mealworms for food: A water footprint perspective. *Water*, 7(10), 6190–6203.
- Mikołajczak, Z., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Kierończyk, B., & Józefiak, D. (2020). The effect of hydrolyzed insect meals in sea trout fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) diets on growth performance, microbiota and biochemical blood parameters. *Animals*, 10(6), 1031.

- Miller, D. J., Kasemset, S., Wang, L., Paul, D. R., & Freeman, B. D. (2014). Constant flux crossflow filtration evaluation of surface-modified fouling-resistant membranes. *Journal of Membrane Science*, 452, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.09.041>
- Mintah, B. K., He, R., Dabbour, M., Agyekum, A. A., Xing, Z., Golly, M. K., & Ma, H. (2019). Sonochemical action and reaction of edible insect protein: Influence on enzymolysis reaction-kinetics, free-Gibbs, structure, and antioxidant capacity. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), e12982. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12982>
- Mohamed, B. A., Fattah, I. R., Yousaf, B., & Periyasamy, S. (2022). Effects of the COVID-19 pandemic on the environment, waste management, and energy sectors: a deeper look into the long-term impacts. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(31), 46438-46457.
- Mollace, V., Ragusa, S., Sacco, I., Muscoli, C., Sculco, F., Visalli, V., ... & Romeo, F. (2008). The protective effect of bergamot oil extract on lecithine-like oxLDL receptor-1 expression in balloon injury-related neointima formation. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 13(2), 120-129.
- Mollace, V., Sacco, I., Janda, E., Malara, C., Ventrice, D., Colica, C., ... & Romeo, F. (2011). Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: from animal models to human studies. *Fitoterapia*, 82(3), 309-316.
- Montesdeoca-Esponda, S., Checchini, L., Del Bubba, M., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodriguez, J. J. (2018). Analytical approaches for the determination of personal care products and evaluation of their occurrence in marine organisms. *Science of the Total Environment*, 633, 405-425.

- 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.
- Moreno, M., Zurita, E., & Giralt, E. (2014). Delivering wasp venom for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 182, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.051>
- Morgan, K., Martucci, N., Kozłowska, A., Gamal, W., Brzeszczyński, F., Treskes, P., ... & Plevris, J. (2019). Chlorpromazine toxicity is associated with disruption of cell membrane integrity and initiation of a pro-inflammatory response in the HepaRG hepatic cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 1408-1416.
- Morley, J. O., Oliver, A. J., & Charlton, M. H. (1998). Theoretical studies on the biocidal activity of 5-chloro-3-isothiazolone. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 429, 103-110.
- Morrone, L. A., Rombolà, L., Pelle, C., Corasaniti, M. T., Zappettini, S., Paudice, P., ... & Bagetta, G. (2007). The essential oil of bergamot enhances the levels of amino acid neurotransmitters in the hippocampus of rat: implication of monoterpene hydrocarbons. *Pharmacological research*, 55(4), 255-262.
- Motlagh, H. A., 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. doi.org/10.3390/w15162978.
- Mouithys-Mickalad, A., Schmitt, E., Dalim, M., Franck, T., Tome, N. M., van Spankeren, M., Serteyn, D., & Paul, A. (2020). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae protein derivatives: Potential to promote animal health. *Animals*, 10(6), 941. <https://doi.org/10.3390/ani10060941>

- Moulay, S. (2015). Poly (vinyl alcohol) functionalizations and applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 54(12), 1289-1319.
- Multisanti, C. R., Impellitteri, F., Cannatà, G., Cotugno, A., Perugini, M., Piccione, G., ... & Rizzo, M. G. (2025b). Discovering the effects of octylisothiazolinone: analysis of physiological changes in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 302, 118563.
- Multisanti, C. R., Riolo, K., Impellitteri, F., Chebbi, I., Faggio, C., & Giannetto, A. (2023b). 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., Riolo, K., Impellitteri, F., Zicarelli, G., Vazzana, I., Cafeo, G., ... & Giannetto, A. (2025a). Bergamot (*Citrus bergamia*) as a potential anti-stress agent: Counteracting cellular and physiological changes by sodium lauryl sulphate in *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, 371, 125939.
- Multisanti, C. R., Zicarelli, G., Caferro, A., Filice, M., Blahova, J., Vazzana, I., ... & Impellitteri, F. (2025c). Personal care products as a potential source of aquatic pollution: Effect of polyvinyl alcohol on physiological and antioxidant responses in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 298, 118336.
- Multisanti, C. R., Zicarelli, G., Caferro, A., Filice, M., Faggio, C., Vazzana, I., ... & 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., Ngwenya, P., Motaung, L. K., Moshuhla, K., & Nomngongo, P. (2023a). Occurrence, effects, and ecological risks of chemicals in sanitizers and disinfectants: A review. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 5, 62-78.

- Musolino, V., Gliozzi, M., Nucera, S., Carresi, C., Maiuolo, J., Mollace, R., ... & Mollace, V. (2019). The effect of bergamot polyphenolic fraction on lipid transfer protein system and vascular oxidative stress in a rat model of hyperlipemia. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 115.
- Myers, B. K., Zhang, B., Lapucha, J. E., & Grayson, S. M. (2014). The characterization of dendronized poly(ethylene glycol)s and poly(ethylene glycol) multi-arm stars using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 808, 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.041>
- 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.
- Nguyen, E. H., Zanutelli, M. R., Schwartz, M. P., & Murphy, W. L. (2014). Differential effects of cell adhesion, modulus and VEGFR-2 inhibition on capillary network formation in synthetic hydrogel arrays. *Biomaterials*, 35(7), 2149–2161. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.045>
- Nguyen, J. A., & Yates, R. M. (2021). Better together: current insights into phagosome-lysosome fusion. *Frontiers in immunology*, 12, 636078.
- Nguyen, T. T. X., Tomberlin, J. K., & Vanlaerhoven, S. (2015). Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. *Environmental Entomology*, 44(2), 406–410.
- NHMRC, N. (2011). Australian drinking water guidelines. *Commonwealth of Australia*.

- 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.
- Noguera-Oviedo, Katia, and Diana S. Aga. "Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment." *Journal of hazardous materials* 316 (2016): 242-251.
- 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.
- Nunes, B., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2005). Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3), 413-419.
- Officioso, A., Tortora, F., & Manna, C. (2016). Nutritional aspects of food toxicology: mercury toxicity and protective effects of olive oil hydroxytyrosol. *J Nutr Food Sci*, 6(539), 2.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.

- Ojha, S., Bußler, S., & Schlüter, O. K. (2020). Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing. *Waste Management*, 118, 600–609.
- Oliveira, F., Doelle, K., List, R., & O'Reilly, J. R. (2015). Assessment of Diptera: Stratiomyidae, genus *Hermetia illucens* (L., 1758) using electron microscopy. *J. Entomol. Zool. Stud*, 3(5), 147-152.
- Oliveira, L. L., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O., & Nunes, B. (2015). Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 123-131.
- Osei-Owusu, J., Yang, J., del Carmen Vitery, M., & Qiu, Z. (2018). Molecular biology and physiology of volume-regulated anion channel (VRAC). *Current topics in membranes*, 81, 177-203.
- Osofsky, S. A., S. Cleaveland, W. B. Karesh, M. D. Kock, P. J. Nyhus, L. Starr, and A. Yang. "Conservation and development interventions at the wildlife/livestock interface." (2005).
- Pacheco, C. R., Hilares, R. T., Andrade, G. C., Mogrovejo-Valdivia, A., & Tanaka, D. A. P. (2021). Emerging contaminants, SARS-COV-2 and wastewater treatment plants, new challenges to confront: a short review. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100731.
- Paciello, S., Russo, T., De Marchi, L., Soares, A. M., Meucci, V., Pretti, 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.

- Paduraru, E., Flocea, E. I., Lazado, C. C., Simionov, I. A., Nicoara, M., Ciobica, A., ... & Jijie, R. (2021). Vitamin C mitigates oxidative stress and behavioral impairments induced by deltamethrin and lead toxicity in zebrafish. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12714.
- 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.
- Paijens, C., Bressy, A., Frère, B., & Moilleron, R. (2020). Biocide emissions from building materials during wet weather: identification of substances, mechanism of release and transfer to the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(4), 3768-3791.
- Palladino, G., Rampelli, S., Scicchitano, D., Nanetti, E., Iuffrida, L., Wathsala, R. H. G. R., ... & Candela, M. (2023). Seasonal dynamics of the microbiome-host response to pharmaceuticals and pesticides in *Mytilus galloprovincialis* farmed in the Northwestern Adriatic Sea. *Science of The Total Environment*, 887, 163948.

- 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(2), 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.
- Pang, H. B., Braun, G. B., She, Z. G., Kotamraju, V. R., Sugahara, K. N., *et al.* (2014). A free cysteine prolongs the half-life of a homing peptide and improves its tumor-penetrating activity. *Journal of Controlled Release*, 175, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.043>
- 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(1), 143-158.
- Pastaki, N. J., Abdollahpour, H., Karimzadeh, M., Zamani, H., Multisanti, C. R., & Faggio, C. (2023). Physiological and immunological impact of methanolic lavender extract on female goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture Reports*, 33, 101841.
- Pastorino, P., Anselmi, S., Zanolli, A., Esposito, G., Bondavalli, F., Dondo, A., ... & Prearo, M. (2023). The invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) as a bioindicator of microplastic pollution: Insights from Lake Candia (northwestern Italy). *Ecological indicators*, 150, 110200.

- Pasupuleti, V. K., Holmes, C., & Demain, A. L. (2010). Applications of protein hydrolysates in biotechnology. In *Protein hydrolysates in biotechnology* (pp. 1-9). Dordrecht: Springer Netherlands.
- 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.
- Peck, A. M. (2006). Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 386(4), 907-939.
- Pendino, G. M. (1998). Il bergamotto in terapia medica: attualità e prospettive. *Essenze e derivati agrumari*, 68(1), 57-62.
- Peng, F., Liu, Y., Li, X., Sun, L., Zhao, D., et al. (2014). PEGylation of G-CSF in organic solvent markedly increases the efficacy and reactivity through protein unfolding, hydrolysis inhibition and solvent effect. *Journal of Biotechnology*, 170, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.024>
- Petek, N. A., & Mullins, R. D. (2014). Bacterial actin-like proteins: purification and characterization of self-assembly properties. In *Methods in Enzymology*, 540 (pp. 19–34). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397924-7.00002-1>
- Petrosino, S., Campolo, M., Impellizzeri, D., Paterniti, I., Allarà, M., Gugliandolo, E., ... & Cuzzocrea, S. (2017). 2-pentadecyl-2-oxazoline, the oxazoline of pea, modulates carrageenan-induced acute inflammation. *Frontiers in pharmacology*, 8, 308.
- Pinto, J., Costa, M., Leite, C., Borges, C., Coppola, F., Henriques, B., ... & Freitas, R. (2019). Ecotoxicological effects of lanthanum in *Mytilus galloprovincialis*: Biochemical and histopathological impacts. *Aquatic toxicology*, 211, 181-192.

- Poli, A., & Fabbri, E. (2018). *Fisiologia degli organismi marini* (2nd ed.). Napoli, Italy: EdiSES s.r.l.
- Porretti, M., Impellitteri, F., Caferro, A., Albergamo, A., Litrenta, F., Filice, M., ... & Faggio, C. (2023). Assessment of the effects of non-phthalate plasticizer DEHT on the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 336, 139273.
- Portran, D. (2014). Micropatterning microtubules. In M. P. & M. T. (Eds.), *Methods in Cell Biology* (pp. 39–51). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417027-8.00003-0>
- Prado, T., Fumian, T. M., Mannarino, C. F., Maranhão, A. G., Siqueira, M. M., & Miagostovich, M. P. (2020). Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, e200196.
- Prego-Faraldo, M. V., Valdiglesias, V., Laffon, B., Eirín-López, J. M., & Méndez, J. (2015). In vitro analysis of early genotoxic and cytotoxic effects of okadaic acid in different cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(13-14), 814-824.
- Proulx, S. T., Luciani, P., Christiansen, A., Karaman, S., Blum, K. S., *et al.* (2013). Use of a PEG-conjugated bright near-infrared dye for functional imaging of rerouting of tumor lymphatic drainage after sentinel lymph node metastasis. *Biomaterials*, 34(21), 5128–5137. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.070>
- Puri, M., Gandhi, K., & Kumar, M. S. (2023). Emerging environmental contaminants: A global perspective on policies and regulations. *Journal of Environmental Management*, 332, 117344.
- Putra, S. N. K. M., Ishak, N. H., & Sarbon, N. M. (2018). Preparation and characterization of physicochemical properties of golden apple snail (*Pomacea*

- canaliculata*) protein hydrolysate as affected by different proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 123-128.
- Rafoth, A., Gabriel, S., Sacher, F., & Brauch, H. J. (2007). Analysis of isothiazolinones in environmental waters by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1164(1-2), 74-81.
 - Rahim, N. F., & Yaqin, K. (2022). Histological alteration of green mussel *Perna viridis* organs exposed to microplastics.
 - Ramírez-Malule, H., Quiñones-Murillo, D. H., & Manotas-Duque, D. (2020). Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. *Emerging contaminants*, 6, 179-193.
 - Ramos, S., Homem, V., Alves, A., & Santos, L. (2015). Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment—a review. *Science of the total Environment*, 526, 278-311.
 - Ransy, C., Vaz, C., Lombès, A., & Bouillaud, F. (2020). Use of H₂O₂ to cause oxidative stress, the catalase issue. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9149.
 - Rapisarda, A., & Germano, M. P. (2013). *Citrus x bergamia* Risso & Poiteau: botanical classification, morphology and anatomy. In *Citrus bergamia–bergamot oil and its derivatives* (pp. 9-24). CRC Press Taylor and Francis Group.
 - Ravi, R., Athisuyambulingam, M., Kanagaraj, S., Tresnakova, N., Impellitteri, F., Viswambaran, G., & Faggio, C. (2023). Impact of chlorpyrifos on cytopathological indices in mangrove crab, *Episesarma tetragonum* (Fabricius). *Veterinary Sciences*, 10(1), 53.

- Resch, G., Moreillon, P., & Fischetti, V. A. (2011). PEGylating a bacteriophage endolysin inhibits its bactericidal activity. *AMB Express*, 1, 29. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-29>
- Richardson, S. D., & Kimura, S. Y. (2016). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical chemistry*, 88(1), 546-582.
- Richardson, S. D., & Ternes, T. A. (2014). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical chemistry*, 86(6), 2813-2848.
- Richardson, S. D., & Ternes, T. A. (2018). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical chemistry*, 90(1), 398-428.
- Richardson, Susan D. "Water analysis: emerging contaminants and current issues." *Analytical chemistry* 81, no. 12 (2009): 4645-4677.
- Riolo, K., Franco, G. A., Marino, Y., Ferreri, A., Oliva, S., Parrino, V., ... & Giannetto, A. (2025). Protein hydrolysates from *Hermetia illucens* trigger cellular responses to cope with LPS-induced inflammation and oxidative stress in L-929 cells. *Animal Cells and Systems*, 29(1), 1-12.
- Riolo, K., Rotondo, A., La Torre, G. L., Marino, Y., Franco, G. A., Crupi, R., ... & Giannetto, A. (2023). Cytoprotective and antioxidant effects of hydrolysates from black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Antioxidants*, 12(2), 519.
- Rocha, T. L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J. P., Sousa, V. S., ... & 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.
- Rojas, O. J., & Stein, H. H. (2015). Effects of replacing fish, chicken, or poultry by-product meal with fermented soybean meal in diets fed to weanling pigs. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 28(1), 22-41.

- Roman, C., Mahé, P., Latchere, O., Catrouillet, C., Gigault, J., Métais, I., & Châtel, A. (2023). Effect of size continuum from nanoplastics to microplastics on marine mussel *Mytilus edulis*: Comparison in vitro/in vivo exposure scenarios. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 264, 109512.
- Romano, L., Battaglia, F., Masucci, L., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Plotti, G., ... & Fadda, G. (2005). In vitro activity of bergamot natural essence and furocoumarin-free and distilled extracts, and their associations with boric acid, against clinical yeast isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(1), 110-114.
- Ruhnke, I., Normant, C., Campbell, D. L. M., Iqbal, Z., Lee, C., Hinch, G. N., & Roberts, J. (2018). Impact of on-range choice feeding with black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) on flock performance, egg quality, and range use of free-range laying hens. *Animal Nutrition*, 4(5), 452–460.
- Russo, R., Ciociaro, A., Berliocchi, L., Cassiano, M. G. V., Rombolà, L., Ragusa, S., ... & Corasaniti, M. T. (2013). Implication of limonene and linalyl acetate in cytotoxicity induced by bergamot essential oil in human neuroblastoma cells. *Fitoterapia*, 89, 48-57.
- Saini, I., Sharma, A., Dhiman, R., Aggarwal, S., Ram, S., & Sharma, P. K. (2017). Grafted SiC nanocrystals: For enhanced optical, electrical and mechanical properties of polyvinyl alcohol. *Journal of Alloys and Compounds*, 714, 172-180.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate polymers*, 82(2), 277-283.

- Saunders, K. J. (2013). Organic polymer chemistry: an introduction to the organic chemistry of adhesives, fibres, paints, plastics, and rubbers. *Springer Science & Business Media*.
- Sauv e, S bastien, and M lanie Desrosiers. "A review of what is an emerging contaminant." *Chemistry Central Journal* 8, no. 1 (2014): 15.
- Saville, S. L., Qi, B., Baker, J., Stone, R., Camley, R. E., *et al.* (2014). The formation of linear aggregates in magnetic hyperthermia: implications on specific absorption rate and magnetic anisotropy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 424, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.01.042>
- Scala, A., Cammack, J. A., Salvia, R., Scieuzo, C., Franco, A., Bufo, S. A., Tomberlin, J. K., & Falabella, P. (2020). Rearing substrate impacts growth and macronutrient composition of *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) larvae produced at an industrial scale. *Scientific Reports*, 10, 19448.
- Schmidt, C., Krauth, T., & Wagner, S. (2017). Export of plastic debris by rivers into the sea. *Environmental science & technology*, 51(21), 12246-12253.
- Schrank, I., Trotter, B., Dummert, J., Scholz-B ttcher, B. M., L der, M. G., & Laforsch, C. (2019). Effects of microplastic particles and leaching additive on the life history and morphology of *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 255, 113233.
- Schwensen, J. F., & Johansen, J. D. (2018). Isothiazolinones. In *Kanerva's Occupational Dermatology* (pp. 1-14). Springer, Cham.
- Schwensen, J. F., Lundov, M. D., Bossi, R., Banerjee, P., Gimenez-Arnau, E., Lepoittevin, J. P., ... & Johansen, J. D. (2015). Methylisothiazolinone and benzisothiazolinone are widely used in paint: a multicentre study of paints from five European countries. *Contact Dermatitis*, 72(3), 127-138.

- Sfriso, A. A., Tomio, Y., Rosso, B., Gambaro, A., Sfriso, A., Corami, F., ... & Munari, C. (2020). Microplastic accumulation in benthic invertebrates in Terra Nova bay (Ross Sea, Antarctica). *Environment international*, 137, 105587.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7749-7759.
- Shang, Y., Wang, X., Chang, X., Sokolova, I. M., Wei, S., Liu, W., ... & Wang, Y. (2021). The effect of microplastics on the bioenergetics of the mussel *Mytilus coruscus* assessed by cellular energy allocation approach. *Frontiers in marine Science*, 8, 754789.
- Vieira, L. R., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2022). Caffeine as a contaminant of concern: a review on concentrations and impacts in marine coastal systems. *Chemosphere*, 286, 131675.
- Sharma, V. K., Anquandah, G. A., Yngard, R. A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., ... & Golovko, D. (2009). Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: a review on occurrence, fate, and treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 44(5), 423-442.
- Shaughnessy, C. N., Malajian, D., & Belsito, D. V. (2014). Cutaneous delayed-type hypersensitivity in patients with atopic dermatitis: reactivity to surfactants. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(4), 704-708.
- 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.
- Sheir, S. K., Handy, R. D., & Galloway, T. S. (2010). Tissue injury and cellular immune responses to mercuric chloride exposure in the common mussel *Mytilus*

edulis: modulation by lipopolysaccharide. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 73(6), 1338-1344.

- Shen, M., Huang, W., Chen, M., Song, B., Zeng, G., & Zhang, Y. (2020). (Micro) plastic crisis: un-ignorable contribution to global greenhouse gas emissions and climate change. *Journal of Cleaner Production*, 254, 120138.
- Sheppard, C. (1983). House fly and lesser fly control utilizing the black soldier fly in manure management systems for caged laying hens. *Environmental Entomology*, 12(6), 1439–1442.
- Silva, A. L., & Wright, S. H. (1994). Short-term cell volume regulation in *Mytilus californianus* gill. *Journal of experimental biology*, 194(1), 47-68.
- Silva, V., Silva, C., Soares, P., Garrido, E. M., Borges, F., & Garrido, J. (2020). Isothiazolinone biocides: chemistry, biological, and toxicity profiles. *Molecules*, 25(4), 991.
- Sirasanagandla, S. R., Al-Huseini, I., Sakr, H., Moqadass, M., Das, S., Juliana, N., & Abu, I. F. (2022). Natural products in mitigation of Bisphenol a toxicity: Future therapeutic use. *Molecules*, 27(17), 5384.
- Smaal, A. C., Ferreira, J. G., Grant, J., Petersen, J. K., & Strand, Ø. (2019). Goods and services of marine bivalves (p. 591). *Springer Nature*.
- Smith, C. E., Soti, S., Jones, T. A., Nakagawa, A., Xue, D., & Yin, H. (2017). Non-steroidal anti-inflammatory drugs are caspase inhibitors. *Cell chemical biology*, 24(3), 281-292.
- Song, W., Tang, Z., Zhang, D., Zhang, Y., Yu, H., *et al.* (2014). Anti-tumor efficacy of c(RGDfK)-decorated polypeptide-based micelles co-loaded with docetaxel and cisplatin. *Biomaterials*, 35(11), 3005–3014.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.082>

- Speciale, A., Zena, R., Calabrò, C., Bertuccio, C., Aragona, M., Saija, A., ... & Cascio, P. L. (2018). Experimental exposure of blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) to high levels of benzo [a] pyrene and possible implications for human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150, 96-103.
- Spranghers, T., Ottoboni, M., Klootwijk, C., Obyn, A., Deboosere, S., De Meulenaer, B., Michiels, J., Eeckhout, M., De Clercq, P., & De Smet, S. (2017). Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2594–2600.
- Stip, E., Rizvi, T. A., Mustafa, F., Javaid, S., Aburuz, S., Ahmed, N. N., ... & Khan, G. (2020). The large action of chlorpromazine: translational and transdisciplinary considerations in the face of COVID-19. *Frontiers in pharmacology*, 11, 577678.
- Stock, F., Kochleus, C., Bänisch-Baltruschat, B., Brennholt, N., & Reifferscheid, G. (2019). Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment—A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 84-92.
- 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.
- Storey, M. V., Van der Gaag, B., & Burns, B. P. (2011). Advances in on-line drinking water quality monitoring and early warning systems. *Water research*, 45(2), 741-747.
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3-B.

- Sulek, M. W., Wasilewski, T., & Kurzydłowski, K. J. (2010). The effect of concentration on lubricating properties of aqueous solutions of sodium lauryl sulfate and ethoxylated sodium lauryl sulfate. *Tribology letters*, 40(3), 337-345.
- Sun, G., Lin, X., Shen, L., Wu, F., Xu, D., *et al.* (2013). Mono-PEGylated radix ophiopogonis polysaccharide for the treatment of myocardial ischemia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(4), 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.05.016>
- Sunila, I. (1987, January). Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). In *Annales Zoologici Fennici* (pp. 55-69). Finnish Academy of Sciences, Societas Scientiarum Fennica, Societas pro Fauna et Flora Fennica and Societas Biologica Fennica Vanamo.
- Surendra, K. C., Tomberlin, J. K., van Huis, A., Cammack, J. A., Heckmann, L.-H. L., & Khanal, S. K. (2020). Rethinking organic wastes bioconversion: Evaluating the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF). *Waste Management*, 117, 58–80.
- Taheran, Mehrdad, Mitra Naghdi, Satinder K. Brar, Mausam Verma, and Rao Y. Surampalli. "Emerging contaminants: here today, there tomorrow!." *Environmental nanotechnology, monitoring & management* 10 (2018): 122-126.
- Tang, F., Sun, Y. X., Shi, Y., Li, X., & Hu, H. Y. (2012). Chemicals consumption and cost analysis of a microfiltration-reverse osmosis process for wastewater reclamation. *China Environmental Science*, 32(9), 1613-1619.
- Tang, S., Zeng, Y., & Wang, X. (2010). Splashing needleless electrospinning of nanofibers. *Polymer Engineering & Science*, 50(11), 2252-2257.

- Tao, J., & Li, Y. O. (2018). Edible insects as a means to address global malnutrition and food insecurity issues. *Food Quality and Safety*, 2(1), 17–26.
- Taubert, K., Kraus, S., & Schulze, B. (2002). Isothiazol-3 (2 H)-ones, part I: Synthesis, reactions and biological activity. *Sulfur reports*, 23(1), 79-121.
- Teng, S., Beard, K., Pourahmad, J., Moridani, M., Easson, E., Poon, R., & O'Brien, P. J. (2001). The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, 130, 285-296.
- Teo, T. L., Coleman, H. M., & Khan, S. J. (2015). Chemical contaminants in swimming pools: Occurrence, implications and control. *Environment international*, 76, 16-31.
- Tesfay, M. Z., Kirk, A. C., Hadac, E. M., Griesmann, G. E., Federspiel, M. J., *et al.* (2013). PEGylation of vesicular stomatitis virus extends virus persistence in blood circulation of passively immunized mice. *Journal of Virology*, 87(7), 3752–3759. <https://doi.org/10.1128/JVI.03325-12>
- Tian, L., Tadepalli, S., Hyun Park, S., Liu, K. K., Morrissey, J. J., *et al.* (2014). Bioplasmonic calligraphy for multiplexed label-free biodetection. *Biosensors & Bioelectronics*, 59, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.045>
- 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(6), 1819-1832.
- Toholka, R., & Nixon, R. (2014). Contact urticaria caused by preservatives and disinfectants. *Contact Urticaria Syndrome*, 261.
- Tong, X., & Yang, F. (2014). Engineering interpenetrating network hydrogels as biomimetic cell niche with independently tunable biochemical and mechanical

properties. *Biomaterials*, 35(7), 1807–1815.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.032>

- Torre, A., Trischitta, F., & Faggio, C. (2013). Effect of CdCl₂ on regulatory volume decrease (RVD) in *Mytilus galloprovincialis* digestive cells. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1260-1266.
- 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.
- Trautwein, C., & Kümmerer, K. (2012). Ready biodegradability of trifluoromethylated phenothiazine drugs, structural elucidation of their aquatic transformation products, and identification of environmental risks studied by LC-MS n and QSAR. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(8), 3162-3177.
- 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. (2023). 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.
- Trestrail, C., Nugegoda, D., & Shimeta, J. (2020). Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system. *Science of the total environment*, 734, 138559.
- Understanding the Canadian Environmental Protection Act (2022). URL: <https://www.canada.ca/en/services/environment/pollution-waste-management/understanding-environmental-protection-act.html>.

- United States. Environmental Protection Agency. Nonpoint Source Control Branch, United States. Environmental Protection Agency. Office of Wetlands, & Oceans. (2005). *National management measures to control nonpoint source pollution from forestry*. US Environmental Protection Agency, Office of Water.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). (2014). Announcement of preliminary regulatory determinations for contaminants on the third drinking water contaminant candidate list. *Federal Register*, 79(202), 62715.
- Usheva, L. N., & Frolova, L. T. (2006). Morphofunctional changes of the digestive gland in the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) in normal conditions and after parasitic invasion by trematodes. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(2), 96-105.
- Uter, W., Wilkinson, S. M., Aerts, O., Bauer, A., Borrego, L., Brans, R., ... & ESSCA and EBS ESCD working groups, and the GEIDAC. (2022). Patch test results with the European baseline series, 2019/20—Joint European results of the ESSCA and the EBS working groups of the ESCD, and the GEIDAC. *Contact Dermatitis*, 87(4), 343-355.
- Van de Manakker, F., van der Pot, M., Vermonden, T., van Nostrum, C. F., & Hennink, W. E. (2008). Self-assembling hydrogels based on β -cyclodextrin/cholesterol inclusion complexes. *Macromolecules*, 41(5), 1766–1773. <https://doi.org/10.1021/ma7027929>
- Van den Heuvel, M. R., Power, M., Richards, J., MacKinnon, M., & Dixon, D. G. (2000). Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(3), 334-341.

- Van Dijk, M., van Nostrum, C. F., Hennink, W. E., Rijkers, D. T., & Liskamp, R. M. (2010). Synthesis and characterization of enzymatically biodegradable PEG and peptide-based hydrogels prepared by click chemistry. *Biomacromolecules*, 11(6), 1608–1614. <https://doi.org/10.1021/bm100304q>
- Van Huis, A., & Oonincx, D. G. A. B. (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(43), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0452-8>
- Van Huis, A., & Oonincx, D. G. A. B. (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37, 43.
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P. (2013). *Edible insects: Future prospects for food and feed security*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Vargas, A., Randazzo, B., Riolo, P., Truzzi, C., Gioacchini, G., Giorgini, E., Gasco, L., & Olivotto, I. (2018). Rearing zebrafish on black soldier fly (*Hermetia illucens*): Biometric, histological, spectroscopic, biochemical, and molecular implications. *Zebrafish*, 15(4), 404–419. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1619>
- Vasanthi, R. L., Arulvasu, C., Kumar, P., & Srinivasan, P. (2021). Ingestion of microplastics and its potential for causing structural alterations and oxidative stress in Indian green mussel *Perna viridis*—A multiple biomarker approach. *Chemosphere*, 283, 130979.
- Vercruyse, L., Smagghe, G., Herregods, G., & Van Camp, J. (2005). ACE inhibitory activity in enzymatic hydrolysates of insect protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5207–5211.
- Vereycken, J. E., & Aldridge, D. C. (2023). Bivalve molluscs as biosensors of water quality: state of the art and future directions. *Hydrobiologia*, 850(2), 231-256.

- Veronese, F. M., & Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, 10(21), 1451–1458. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03627-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03627-3)
- Vignaud, T., Ennomani, H., & Théry, M. (2014). Polyacrylamide hydrogel micropatterning. In *Methods in Cell Biology*, 120 (pp. 93–116). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420139-2.00005-0>
- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Köhler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental science & technology*, 46(20), 11327-11335.
- Wang, Q., Yuan, Z., Wu, H., Liu, F., & Zhao, J. (2013). Molecular characterization of a manganese superoxide dismutase and copper/zinc superoxide dismutase from the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5), 1345-1351.
- Wang, Y., Chen, M., Wang, C., Meng, X., Zhang, W., Chen, Z., & Crittenden, J. (2019). Electrochemical degradation of methylisothiazolinone by using Ti/SnO₂-Sb₂O₃/α, β-PbO₂ electrode: Kinetics, energy efficiency, oxidation mechanism and degradation pathway. *Chemical Engineering Journal*, 374, 626-636.
- Waselkov, G. A. (1987). Shellfish gathering and shell midden archaeology. In *Advances in archaeological method and theory* (pp. 93-210). Academic Press.
- Webster, C. D., Rawles, S. D., Koch, J. F., Thompson, K. R., Kobayashi, Y., Gannam, A. L., Twibell, R. G., & Hyde, N. M. (2016). Bio-Ag reutilization of distiller's dried grains with solubles as a substrate for black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, along with poultry by-product meal and soybean meal, as total replacement of fish meal in diets. *Aquaculture Nutrition*, 22(5), 976–988.

- Westheide, W., & Rieger, R. (2011). *Zoologia sistematica, filogenesi e diversità degli animali* (A. Minelli, Ed.). Bologna, Italy: Zanichelli Editore S.p.A.
- Wick, A., Fink, G., & Ternes, T. A. (2010). Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(14), 2088-2103.
- Xiao, W., & Loscalzo, J. (2020). Metabolic responses to reductive stress. *Antioxidants & redox signaling*, 32(18), 1330-1347.
- Yan, Y., Zhu, F., Zhu, C., Chen, Z., Liu, S., Wang, C., & Gu, C. (2021). Dibutyl phthalate release from polyvinyl chloride microplastics: Influence of plastic properties and environmental factors. *Water Research*, 204, 117597.
- 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, M., Mohanty, P., & Ghosh, G. (2014). Morphology and properties of poly vinyl alcohol (PVA) scaffolds: impact of process variables. *Materials Science and Engineering: C*, 42, 289-294.
- Yen, A. L. (2009). Edible insects: Traditional knowledge or western phobia?. *Entomological research*, 39(5), 289-298.
- Yu, P., Guo, Z., Wang, T., Wang, J., Guo, Y., & Zhang, L. (2024). Elucidating the photodegradation mechanism of octylisothiazolinone and dichlorooctylisothiazolinone in surface water: An in-depth comprehensive analysis. *Science of The Total Environment*, 946, 174185.

- Yu, T. Y., Morton, J. D., Clerens, S., & Dyer, J. M. (2017). Cooking-induced protein modifications in meat. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 141–159.
- Yuan, S., Jiang, X., Xia, X., Zhang, H., & Zheng, S. (2013). Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere*, 90(10), 2520-2525.
- Zeiger, K., Popp, J., Becker, A., Hankel, J., Visscher, C., Klein, G., & Meemken, D. (2017). Lauric acid as feed additive—An approach to reducing *Campylobacter* spp. in broiler meat. *PLoS ONE*, 12(4), e0175693.
- Zhang, Z., Li, W., Zhao, Q., Cheng, M., Xu, L., *et al.* (2014). Highly sensitive visual detection of copper (II) using water-soluble azide-functionalized gold nanoparticles and silver enhancement. *Biosensors & Bioelectronics*, 59, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.027>
- Zhao, X., Han, Y., Chen, B., Xia, B., Qu, K., & Liu, G. (2020). CO₂-driven ocean acidification weakens mussel shell defense capacity and induces global molecular compensatory responses. *Chemosphere*, 243, 125415.
- Zhou, F., Tomberlin, J. K., Zheng, L., Yu, Z., & Zhang, J. (2013). Developmental and waste reduction plasticity of three black soldier fly strains (Diptera: Stratiomyidae) raised on different livestock manures. *Journal of Medical Entomology*, 50(6), 1224–1230.
- Zhou, J., Hao, G., Weng, H., Tsai, Y. T., Baker, D. W., *et al.* (2013). In vivo evaluation of medical device-associated inflammation using a macrophage-specific positron emission tomography (PET) imaging probe. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(8), 2044–2047. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.091>

- Zhu, D., Huang, X., Tu, F., Wang, C., & Yang, F. (2020). Preparation, antioxidant activity evaluation, and identification of antioxidant peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae. *Journal of Food Biochemistry*, 44(5), e13186.
- Zhu, D., Huang, X., Tu, F., Wang, C., & Yang, F. (2020). Preparation, antioxidant activity evaluation, and identification of antioxidant peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae. *Journal of Food Biochemistry*, 44(7), e13186. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13186>
- Zhu, M., & Carta, G. (2014). Adsorption of polyethylene-glycolated bovine serum albumin on macroporous and polymer-grafted anion exchangers. *Journal of Chromatography A*, 1326, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.042>
- Zielińska, E., Baraniak, B., & Karaś, M. (2017a). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hydrolysates and peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis of selected heat-treated edible insects. *Nutrients*, 9(9), 970.
- Zielińska, E., Baraniak, B., & Karaś, M. (2018). Identification of antioxidant and anti-inflammatory peptides obtained by simulated gastrointestinal digestion of three edible insect species (*Gryllobates sigillatus*, *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria*). *International Journal of Food Science and Technology*, 53(11), 2542–2551.
- Zielińska, E., Karaś, M., & Jakubczyk, A. (2017b). Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 306–312.
- Zinsstag, Jakob, Esther Schelling, David Waltner-Toews, and Marcel Tanner. "From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being." *Preventive veterinary medicine* 101, no. 3-4 (2011): 148-156.