



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE BIOLOGICHE

FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA E

MEDICINA SPERIMENTALE

XXXVII CICLO

Coordinatore Prof.ssa Emanuela ESPOSITO

SSD BIOS/06A (ex BIO/09) CHEM/07B (ex CHIM/10)

Contaminanti Organici nei Prodotti per la Cura Personale: bioaccumulo ed effetti *in vivo* e *in vitro* su organismi acquatici e sull'uomo

Dottorando

Dott.ssa Miriam PORRETTI

Tutor

Prof.ssa Caterina FAGGIO

Co-Tutor

Prof.ssa Giuseppa DI BELLA

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del Progetto Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005) risorse FSE REACT-EU, Azione IV.4 "Dottorati e contratti di ricerca su tematiche dell'innovazione" e Azione IV.5 "Dottorati su tematiche Green"

Anno Accademico 2023/2024

Indice

INDICE	2
CENNI STORICI	6
1. INTRODUZIONE	10
1.1. Cosa sono i Personal Care products?	10
1.1.1. Quali sono i prodotti per la cura personale?	10
1.1.2. Il mercato globale della cura personale	13
1.1.3. Il mercato Europeo e Italiano	14
1.1.4. Come la pandemia da COVID-19 ha modificato la cura della persona	17
1.2. Formulazione e Additivi	18
1.3. Aspetti normativi sui contaminanti	20
1.4. Quali sono gli ingredienti proibiti nei cosmetici?	22
1.5. Tossicologia (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	23
2. OBIETTIVI DEL PROGETTO	26
3. CONTAMINANTI ORGANICI	29
3.1. Effetti del plastificante non-ftalico DEHT sulla specie <i>Mytilus galloprovincialis</i>	29
3.1.1. Premesse	29
3.1.1.1. Cosa sono i plastificanti	34
3.1.1.2. Plastiche e plastificanti in prodotti per la cura personale	36
3.1.1.3. Normative e regolamenti	38
3.1.2. Materiali e Metodi	40
3.1.2.1. Disegno sperimentale	40
3.1.2.2. Raccolta dei campioni	41
3.1.2.3. Determinazione del DEHT nei campioni di cozze e di acqua	42
3.1.2.4. Lipidi totali e composizione degli acidi grassi	43
3.1.2.5. Proteine totali	45
3.1.2.6. Saggi di vitalità cellulare	45
3.1.2.7. Diminuzione della regolazione del volume cellulare	47
3.1.2.8. Determinazione di biomarcatori antiossidanti e di perossidazione lipidica e di proteine ossidativamente modificate	48
3.1.2.9. Analisi statistica	49
3.1.3. Risultati	50
3.1.3.1. Livelli di DEHT nei campioni di <i>M. galloprovincialis</i> e nell'acqua di stabulazione	50
3.1.3.2. Lipidi totali e contenuto degli acidi grassi	51
3.1.3.3. Proteine totali	53
3.1.3.4. Vitalità cellulare	54
3.1.3.5. Diminuzione della capacità regolatoria del volume cellulare	55
3.1.3.6. Valutazione dello stato ossidativo	56
3.1.4. Discussioni	59

3.1.5 Conclusioni	65
3.2. Sostanze poli- e per-fluoroalchiliche (PFAS) in <i>Sander lucioperca</i>: distribuzione nei fiumi delle Fiandre e potenziale impatto sulla salute umana.	66
3.2.1. Premesse	66
3.2.1.1. Regolamenti e normative Europee	69
3.2.1.2. I PFAS nei Prodotti per la cura della Persona	73
3.2.2. Materiali e Metodi	74
3.2.2.1. Campionamento	74
3.2.2.2. Preparazione ed estrazione dei PFAS dai campioni	75
3.2.2.3. Valutazione del rischio sull'uomo	77
3.2.2.4. Statistica	78
3.2.3. Risultati	79
3.2.3.1. Concentrazione dei PFAS	79
3.2.3.2. Rischi per la salute umana	83
3.2.3.3. Analisi Statistica	85
3.2.4. Discussioni	87
3.2.5. Conclusioni	92
3.3. Valutazione <i>in vitro</i> delle alterazioni cellulari e fisiologiche di <i>Mytilus galloprovincialis</i> esposte al benzisotiazolinone (BIT)	93
3.3.1. Premesse	93
3.3.1.1. Regolamentazione sui conservanti e antimicrobici	95
3.3.1.2. I conservanti e gli antimicrobici nei prodotti per la cura della persona	96
3.3.2. Materiali e Metodi	99
3.3.2.1. Raccolta e acclimatazione della specie	99
3.3.2.2. Raccolta dell'emolinfa e dissezione del muscolo dei mitili	99
3.3.2.3. Esposizione <i>in vitro</i>	99
3.3.2.4. Valutazione della vitalità degli emociti e delle cellule della ghiandola digestiva	100
3.3.2.5. Analisi della Fagocitosi	100
3.3.2.6. Analisi Statistica	101
3.3.3. Risultati	102
3.3.3.1. Vitalità cellulare	102
3.3.3.2. Valutazione dell'attività Fagocitaria	103
3.3.3.3. Regolazione del volume cellulare	104
3.3.4. Discussioni	107
3.3.5. Conclusioni	109
3.4. Bergamotto (<i>Citrus bergamia</i>): un nuovo potenziale agente nutraceutico per contrastare le alterazioni indotte dal Sodio Lauril Solfato in <i>Mytilus galloprovincialis</i>	110
3.4.1. Premesse	110
3.4.1.1. Regolamenti sul Sodio lauril solfato	113
3.4.1.2. SLS nei prodotti per la cura della persona e nell'ambiente	114
3.4.2. Materiali e Metodi	115
3.4.2.1. Disegno Sperimentale	115
3.4.2.2. Raccolta dei campioni	116
3.4.2.3. Analisi del Bisso	116
3.4.2.4. Lipidi Totali e composizione degli Acidi Grassi	116
3.4.2.5. Proteine Totali	117
3.4.2.6. Carotenoidi	118
3.4.2.7. Tocoferoli	118
3.4.2.8. Analisi Statistica	119
3.4.3. Risultati	120

3.4.3.1.	Alterazioni del Bisso	120
3.4.3.2.	Lipidi Totali e Composizione in Acidi Grassi	121
3.4.3.3.	Proteine Totali	124
3.4.3.4.	Carotenoidi	125
3.4.3.5.	Tocoferoli	125
3.4.4.	Discussioni	126
3.4.5.	Conclusioni	130
3.5.	Valutazione del <i>Mytilus galloprovincialis</i> dopo esposizione al metabolita dell'erbicida propaclor ESA	131
3.5.1.	Premesse	131
3.5.1.1.	Regolamentazione sui prodotti fitosanitari	135
3.5.1.2.	Prodotti fitosanitari nei prodotti per la cura della persona	136
3.5.2.	Materiali e Metodi	138
3.5.2.1.	Disegno sperimentale	138
3.5.2.2.	Bioaccumulo del propaclor ESA nell'acqua e negli organismi	139
3.5.2.3.	Fattore di bioconcentrazione	141
3.5.2.4.	Vitalità cellulare e analisi della Ghiandola Digestiva	142
3.5.2.5.	Profilo biochimico dell'emolinfa	142
3.5.2.6.	Valutazione dei biomarker di stress ossidativo e perossidazione lipidica	142
3.5.2.7.	Indici di condizione istopatologica	142
3.5.2.8.	Analisi Statistica	143
3.5.3.	Risultati	144
3.5.3.1.	Concentrazione bioaccumulata del propaclor ESA	144
3.5.3.2.	Fattore di bioconcentrazione	145
3.5.3.3.	Profilo biochimico e vitalità cellulare dell'emolinfa	145
3.5.3.4.	Diminuzione della Regolazione del Volume cellulare	147
3.5.3.5.	Stress ossidativo	148
3.5.3.5.	Modifiche istologiche	150
3.5.4.	Discussioni	156
3.5.5.	Conclusioni	163
3.6.	Impatto della Clorpromazina sul <i>Mytilus galloprovincialis</i>: un'indagine su più fronti	164
3.6.1.	Premesse	164
3.6.1.1.	I prodotti farmaceutici nell'ambiente marino	169
3.6.1.2.	Farmaci nei prodotti per la cura della persona	172
3.6.2.	Materiali e metodi	174
3.6.2.1.	Disegno sperimentale	174
3.6.2.2.	Estrazione della clorpromazina dai campioni	175
3.6.2.3.	Markers di biotrasformazione e tossicità	177
3.6.2.4.	Attività apoptotica	178
3.6.2.5.	Saggio delle metallotioneine	178
3.6.2.6.	Valutazioni istologiche	179
3.6.2.7.	Analisi del Bisso	180
3.6.2.8.	Analisi statistica	180
3.6.3.	Risultati	181
3.6.3.1.	Bioaccumulo di clorpromazina nei molluschi	181
3.6.3.2.	Attività di biotrasformazione	182
3.6.3.3.	Segnali di danno cellulare	184
3.6.3.4.	Segnali di alterazioni morfologiche	185
3.6.3.5.	Alterazioni del Bisso	187
3.6.4.	Discussioni	189
3.6.5.	Conclusioni	197

3.7. Effetti dell'ACE inibitore Enalapril su <i>Mytilus galloprovincialis</i>: Approfondimenti sulle risposte morfologiche e funzionali	198
3.7.1. Premesse	198
3.7.1. La presenza di farmaci cardiaci nel mercato e nell'ambiente	201
3.7.2. Materiali e Metodi	204
3.7.2.1. Animali	204
3.7.2.2. Bioaccumulo	205
3.7.2.3. Analisi del Bisso	206
3.2.7.4. Raccolta dei campioni di emolinfa, dissezione delle cozze, valutazione della vitalità cellulare di emociti e ghiandola digestiva e meccanismo di regolazione del volume	206
3.2.7.5. Osservazioni istologiche e di immunofluorescenza	206
3.2.7.6. Markers di ossidazioni, attività di enzimi antiossidanti, di perossidazione lipidica e di proteine ossidativamente modificate	207
3.2.7.7. Analisi Statistica	208
3.2.8. Risultati	209
3.2.8.4. Bioaccumulo	209
3.2.8.5. Alterazione del Bisso	209
3.2.8.6. Valutazione della vitalità cellulare	210
3.2.8.7. Meccanismo di Regolazione del Volume	211
3.2.8.8. Osservazioni morfologiche	213
3.2.8.9. Immunolocalizzazione delle proteine correlate allo stress	214
3.2.8.10. Valutazione dello stato ossidativo	217
3.2.9. Discussioni	218
3.2.10. Conclusioni	224
 4. L'UOMO È IL SOGGETTO CHE SUBISCE LE CONSEGUENZE DELL'ESPOSIZIONE A CONTAMINANTI ORGANICI	 225
 5. CONCLUSIONI	 234
 6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	 238
 RINGRAZIAMENTI	 ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.

Cenni Storici

L'arte di prendersi cura del corpo ha origine antiche e l'uso di prodotti cosmetici si può far risalire già dal 4000 a.C. Per migliaia di anni l'arte del trucco ha avuto molteplici scopi, oltre a quelli semplici estetici. A seconda del diverso periodo storico e della civiltà di appartenenza, l'uso di cosmetici ha avuto finalità ad esempio religiose, politiche, mediche e sociali che modellarono il mondo antico e moderno.

Sembra che già l'uomo di Neanderthal dipingesse il proprio viso con pigmenti (come succhi di bacche, terre argillose, ecc.) a scopi rituali e simbolici. Ciò dimostra che gli uomini del preistorico conoscevano già l'arte della pittura corporea migliaia di anni fa.

Gli egizi furono tra i primi a valorizzare la bellezza e a creare una vasta gamma di prodotti, come unguenti e le prime palette di trucchi. Gli unguentari o vaso lacrimale o lacrimatoio, erano piccole ampole in vetro o materiali preziosi come oro, argento, rame, agata, alabastro ecc., sui quali era inciso il nome del prodotto in esso contenuto e le istruzioni d'uso (una antica versione delle nostre etichette) che contenevano unguenti o profumi. Le tavolette o palette, erano piccole lastre di pietra (che poteva essere calcare, scisto o alabastro) variamente scolpite e decorate con ornamenti, e utilizzate come base per la miscelazione di polveri colorate e olii da applicare in seguito sul viso. La cosmesi nell'antico Egitto aveva scopi religiosi e sociali ben definiti. Olio di oliva, mandorle, sesamo, lavanda, incenso, mirra, timo e origano venivano usati da sacerdoti e sacerdotesse per colorarsi e profumarsi il corpo in specifici rituali, oltre ad essere ingredienti fondamentali nel processo della mummificazione. Tuttavia, il trucco era anche uno status symbol: era un segno evidente di una classe sociale privilegiata poiché i cosmetici non erano alla portata di tutti.

I Greci svilupparono successivamente un rigoroso canone di bellezza e perfezione fisica, soprattutto durante l'età classica, e i prodotti per la cura del corpo erano una parte importante di questo processo. Il mondo greco importò molti dei prodotti per la cosmesi dall'Egitto, che era ancora considerato la vera patria del culto della bellezza. L'aspetto esteriore era così importante che ad Atene esistevano magistrati speciali chiamati ginecomi, che avevano il compito di multare le donne che apparivano sciatte e poco curate nell'abbigliamento e nel trucco.

Le donne aristocratiche dell'antica Roma dedicavano una parte significativa della loro giornata alla cura del proprio corpo. L'abbigliamento e la scelta degli ornamenti erano importanti come

lo sono oggi, così come l'arte del trucco e della cura della pelle ispirati dalla tradizione greca. Poter sfoggiare una pelle luminosa, rosea e priva di imperfezioni era il massimo tratto di bellezza per una donna romana. Non a caso, i Romani sono considerati i veri precursori delle maschere per il viso da applicare ogni mattina. Inoltre, erano disponibili creme per il viso fatte di lanolina (estratta dal grasso della lana) che veniva utilizzata come base della miscela, e l'aggiunta di amido (ancora utilizzato come ingrediente) che ammorbidiva la pelle e ossido di stagno che sbiancava.

Nel Medioevo, la cura del corpo e il trucco erano spesso riservati a occasioni speciali. Tuttavia, in questo periodo storico, fu scritto il Primo Trattato di Cosmética della Storia, noto come "De Ornatu Mulierum" (Opera di Trotula de Ruggiero). Questo trattato forniva alle donne istruzioni su come preservare e migliorare la loro bellezza, nonché su come curare le malattie della pelle attraverso una serie di precetti, consigli e rimedi naturali. Tra le raccomandazioni c'erano suggerimenti su come nascondere le rughe, rimuovere i gonfiori dagli occhi e dal viso, schiarire la pelle e coprire le macchie. Questo documento rappresenta così l'iniziatore di un importante passo nella storia della cosmetica e dimostra come l'interesse per la bellezza e la cura del corpo sia sempre esistito, anche nei secoli passati. Gli ingredienti fondamentali del trucco viso in quel periodo erano però un pericoloso miscuglio di polvere di piombo, aceto e miele. Questa combinazione conferiva all'incarnato un colore bianco opaco. Tuttavia, con il passare del tempo, questo intruglio non solo deturpava la pelle, ma anche la corrodeva.

Dopo il buio degli anni del Medioevo, emerge una nuova luce nel mondo del make-up grazie all'epoca del Rinascimento. La scoperta dell'America ampliò l'apertura verso il trucco e l'abbigliamento. Si raggiunse uno sviluppo del make-up tale da offrire le prime trousse con varie formulazioni per il trucco di tutto il viso.

Nel 1700-1800 con l'avvento dell'epoca Vittoriana si ha un declino dell'uso dei cosmetici, spesso associato a prostitute ed attrici, i migliori trucchi erano riservati alle nobildonne, che usavano ancora una volta ingredienti tossici, quali il piombo e l'arsenico e l'ossido di zinco per avere una pelle diafana, in quanto una pelle abbronzata era associata a chi lavorava nei campi. Nella seconda metà dell'Ottocento, la cosmetologia però subì un notevole perfezionamento grazie all'evoluzione nel campo della chimica. Furono prodotti ombretti e rossetti su scala industriale, ma purtroppo molti dei materiali che li costituivano si rivelarono tossici.

Nel corso del XX secolo, la storia della cosmesi ha subito una vera e propria rivoluzione. Vi è la nascita delle case cosmetiche, nei primi anni del '900. Questo evento cambia completamente i

canoni estetici. Non più donne dal colorito pallido, ma dive che diventano vere e proprie icone di bellezza. Le dive del cinema e della moda diventano modelli di bellezza. La scelta non è più univoca, e l'offerta cosmetica si amplia sempre di più sul mercato, offrendo una varietà di opzioni. E si ha un'evoluzione dei canoni estetici. L'attenzione si sposta verso l'individualità e la creatività nell'uso del trucco. Ogni persona può esprimere la propria personalità attraverso il make-up. Nel corso del secolo, inoltre l'industria cosmetica si espande notevolmente. Nuovi prodotti, colori e tecniche di applicazione vengono introdotti. Il trucco diventa inoltre accessibile a un pubblico sempre più vasto.

Nell'epoca moderna, l'industria cosmetica ha subito una serie di trasformazioni significative, rispecchiando i cambiamenti culturali, sociali e tecnologici. Aspetti chiave sono stati:

- L'innovazione e ricerca scientifica: L'era moderna ha visto un notevole progresso nella ricerca scientifica e tecnologica. Questo ha avuto un impatto diretto sulla cosmetica. Gli scienziati hanno sviluppato nuovi ingredienti, formulazioni e processi di produzione. Ad esempio, la scoperta di antiossidanti, acidi ialuronici e peptidi ha rivoluzionato la skincare moderna.
- La sostenibilità e cosmesi pulita: I consumatori moderni sono sempre più consapevoli dell'ambiente e della salute. Ciò ha spinto l'industria a creare prodotti sostenibili, cruelty-free e privi di sostanze tossiche. Le marche si impegnano a utilizzare imballaggi riciclabili e a ridurre l'impatto ambientale.
- Diversità e inclusività: Negli ultimi anni, c'è stata una maggiore attenzione alla diversità e all'inclusività. Le marche cercano di rappresentare una vasta gamma di tonalità della pelle, tipi di capelli e caratteristiche fisiche. Questo movimento ha portato a una maggiore varietà di prodotti adatti a tutte le persone.
- Social media e influencer: I social media hanno rivoluzionato il modo in cui le persone scoprono e acquistano prodotti cosmetici e per la cura personale. Gli influencer e i beauty blogger hanno un ruolo significativo nel promuovere nuovi prodotti e tendenze. Le recensioni online e i tutorial video hanno un impatto diretto sulle decisioni di acquisto dei consumatori.
- Personalizzazione: Oggi, molte marche offrono prodotti personalizzati. Dalle basi per il trucco alle creme per la cura della pelle, è possibile adattare i prodotti alle esigenze specifiche di ciascun individuo. Questo approccio mira a soddisfare le esigenze uniche di ogni consumatore.

In sintesi, l'epoca moderna ha portato a una maggiore consapevolezza, innovazione e attenzione alla sostenibilità e all'inclusività nell'industria cosmetica. Vi è però il risvolto della medaglia. L'uso massiccio e prolungato dei prodotti per la cura della persona nel corso del tempo ha portato ad una dispersione di sostanze chimiche di diversa natura nell'ambiente. Questi composti sono così finiti nelle acque superficiali o sotterranee attraverso i lavaggi, il risciacquo o lo smaltimento inappropriato. Anche se l'epoca moderna ha portato a una crescente consapevolezza e tendenza verso i cosmetici così detti naturali. Si ricerca sempre di più prodotti realizzati con ingredienti biologici, sostenibili e privi di sostanze chimiche aggressive, riflettendo una crescente consapevolezza ambientale e una maggiore preoccupazione per la nostra salute. L'upcycling è una pratica che sta guadagnando nell'ultimo periodo, popolarità nel mondo della bellezza. Consiste nel riutilizzare materiali o oggetti per creare nuovi prodotti. Ad esempio, alcune aziende producono imballaggi per i prodotti cosmetici utilizzando bottiglie di vetro riciclate o materiali di scarto. Collegandosi in questo modo al concetto di "zero waste beauty", che si basa sulla riduzione degli sprechi. Le marche stanno cercando di creare imballaggi minimali o riciclabili e di produrre quantità precise di prodotti per evitare gli sprechi. Sempre più aziende inoltre stanno adottando imballaggi eco-friendly, come contenitori in vetro o materiali biodegradabili. Tutto questo atto a ridurre l'impatto ambientale dei prodotti cosmetici.

Ma gli effetti sulla vita acquatica sono una delle principali preoccupazioni quando si tratta dell'impatto dei prodotti per la cura personale sull'ambiente. La biodiversità acquatica è un pilastro essenziale per la vita umana e per l'equilibrio dell'ecosistema. Possiamo vedere come la salute umana è strettamente legata alla preservazione degli organismi acquatici. Gran parte dell'ossigeno che respiriamo proviene dal fitoplancton presente negli oceani, in quanto questi microorganismi fotosintetici producono ossigeno durante il loro ciclo vitale. Senza di loro, l'aria che respiriamo sarebbe molto diversa e meno adatta alla vita umana. Inoltre, l'acqua dolce che beviamo proviene principalmente da fiumi, laghi e falde acquifere. La salute umana dipende così dalla qualità di queste risorse. Gli organismi acquatici molto spesso filtrano e purificano l'acqua, rimuovendo contaminanti e sostanze nocive, in quanto sono in grado di accumulare farmaci, metalli pesanti e altre sostanze chimiche presenti nell'acqua. L'ecosistema acquatico è inoltre una fonte di cibo per l'uomo. Pesci, crostacei e molluschi sono parte integrante della nostra dieta. Tramite il consumo di questi organismi, potenzialmente contaminati, potremmo essere così esposti a tali sostanze. Pertanto, proteggere gli organismi acquatici significa anche proteggere anche noi stessi.

1. Introduzione

1.1. Cosa sono i Personal Care products?

I prodotti per la cura della persona sono beni di consumo che vengono applicati su varie parti esterne del corpo come pelle, sistema pilifero e capelli, unghie, labbra, le aree genitali esterne, mucose della cavità orale e denti, al fine di pulire, proteggere da germi e batteri e mantenere in buone condizioni i tessuti (Aliko et al., 2019). Questi prodotti promuovono l'igiene personale e la salute in generale, il benessere e perfezionare l'aspetto del corpo (articolo 2 del Regolamento (CE) n.1223/2009). Gli articoli da toeletta rappresentano una categoria più specifica di prodotti per la cura personale, utilizzati per l'igiene e la pulizia di base come parte della routine quotidiana. Questi prodotti comprendono articoli come sapone, shampoo, dentifricio, rasoi, spazzolini da denti e deodoranti (Darbre, 2023).

D'altra parte, i prodotti cosmetici sono destinati alla cura e all'abbellimento personale. Questi prodotti migliorano esteticamente l'aspetto di una persona e includono elementi come trucco, profumi, creme idratanti, smalti per unghie e in generale prodotti per la cura della pelle.

Infine, i prodotti farmaceutici non sono considerati prodotti per la cura della persona. Essi sono invece utilizzati per trattare specifiche condizioni mediche e richiedono spesso una prescrizione medica. Questi includono farmaci come antibiotici, antidolorifici, antinfiammatori e altri prodotti simili. Molto spesso i prodotti per la cura personale vengono inseriti erroneamente forse nella macrocategoria dei PPCPs (pharmaceuticals and personal care products).

La maggior parte dei prodotti per la cura della persona viene lavata via subito dopo l'uso, come shampoo, saponi in genere, dentifrici, scrub, gel doccia, ecc., altri prodotti invece sono destinati ad essere lasciati sulla superficie applicata, come creme idratanti, creme solari, ecc (Sharma et al., 2009).

1.1.1. Quali sono i prodotti per la cura personale?

Non vi è una definizione precisa di prodotto per la cura personale. Molto spesso si fa riferimento a questi prodotti come cosmetici, anche se essi sono solamente una sottocategoria della grande famiglia dei prodotti per la cura personale. Si fa spesso

riferimento al Regolamento (CE) n. 1223/2009 che indica non solo la definizione di “prodotto cosmetico”, ma anche tutti i vari aspetti relativi a questi prodotti, come le pratiche di fabbricazione, la loro composizione e presentazione, sicurezza, la sperimentazione animale, l'immissione in commercio e le informazioni sui possibili effetti indesiderati. L'articolo 2 del suddetto regolamento sancisce che per prodotto cosmetico si intende: “qualsiasi sostanza o miscela destinata ad essere applicata sulle superfici esterne del corpo umano (epidermide, sistema pilifero e capelli, unghie, labbra, organi genitali esterni) oppure sui denti e sulle mucose della bocca allo scopo esclusivamente o prevalentemente di pulirli, profumarli, modificarne l'aspetto, proteggerli, mantenerli in buono stato o correggere gli odori corporei” (Regolamento (CE) n. 1223/2009).

I prodotti per la cura personale possono essere suddivisi in diverse categorie a seconda della loro funzione e area di applicazione.

- Prodotti di pulizia: che possono includere saponi in vari formati (liquidi, gel, solidi), olii per il corpo e lozioni, dischetti detergenti e salviette umidificate. Hanno il compito di rimuovere lo sporco, l'olio in eccesso e altre impurità dalla superficie del corpo e migliorano la pulizia generale della persona. Per una pulizia più profonda si utilizzano scrub esfolianti.
- Prodotti per la cura dei capelli: comprendono shampoo, balsami, oli e trattamenti per capelli e vengono utilizzati per detergere, condizionare e trattare i capelli in modo che siano puliti e sani. I sieri idratano e nutrono il cuoio capelluto.
- Prodotti per la rimozione di peli: vi sono creme da barba, gel da barba, schiume da barba, kit per la ceretta e creme per la depilazione. Vengono utilizzati per rimuovere i peli indesiderati da varie parti del corpo.
- Prodotti per l'igiene orale: si tratta di dentifrici, spazzolino, collutorio, filo interdentale, idropulsori, spazzolino interdentale, massaggiatore gengivale, gel gengivale, ecc. Servono a mantenere l'igiene orale, a prevenire la carie e le malattie del cavo orale e ad avere denti e gengive sani. I raschietti per la lingua servono a rimuovere i residui di cibo, le cellule morte e i batteri dalla superficie della lingua. I prodotti per la cura delle protesi dentarie sono utilizzati per pulire le protesi artificiali.

- Prodotti per la cura della pelle: polveri, polveri per bambini, lozioni per il corpo, creme per le mani, pomate e creme idratanti per il viso, creme, olii e lozioni per il corpo. Sono utilizzati per idratare, nutrire la pelle e mantenerla morbida, liscia e protetta. I balsami per labbra mantengono specificatamente le labbra idratate.
- Prodotti per la cura dal sole: comprendono lozioni, creme, spray, gel, oli e stick che fungono da protezione solare o da schermo solare. Proteggono la pelle dalle radiazioni ultraviolette nocive e quindi prevengono le scottature, l'invecchiamento precoce e il cancro della pelle. Le polveri contro il caldo prevengono o leniscono le eruzioni cutanee pruriginose, irritate e arrossate dovute all'eccesso di calore. I doposoli (creme, gel, spray) danno sollievo da lievi scottature e aiutano a ristabilire la normale barriera cutanea.
- Prodotti per la cura della donna: si tratta di assorbenti igienici, tamponi, coppette mestruali e salvaslip. Sono utilizzati per l'igiene mestruale e forniscono comfort, assorbimento e protezione durante le mestruazioni.
- Prodotti per la cura delle unghie: smalti e olii per il letto ungueale, creme e olii per cuticole. Sono utilizzati per mantenere e migliorare l'aspetto delle unghie e promuoverne una crescita sana.
- Prodotti per la cura degli occhi: includono lacrime artificiali o colliri lubrificanti per idratare e lenire gli occhi e fornire sollievo da secchezza, irritazione e disagio dovuti alla sindrome dell'occhio secco o a fattori ambientali; soluzioni per lenti a contatto per la pulizia, la disinfezione e la conservazione delle lenti a contatto e per rimuovere detriti, batteri e accumuli proteici dalle lenti; colliri (tipicamente contenenti antistaminici e stabilizzatori dei mastociti) per le allergie per fornire sollievo da prurito, arrossamento e lacrimazione causati da reazioni allergiche; creme per gli occhi, che sono speciali idratanti per la pelle sensibile del contorno occhi e contengono ingredienti come acido ialuronico, peptidi e antiossidanti per idratare, rassodare e ridurre l'aspetto di linee sottili e rughe; sieri per il contorno occhi per attenuare borse, occhiaie e segni del tempo; detergenti per le palpebre per pulire e lenire le palpebre e le ciglia rimuovendo i detriti, l'olio in eccesso e i batteri, contribuendo così ad alleviare l'infiammazione delle palpebre, la blefarite o la sindrome dell'occhio secco; maschere per gli occhi, che siano maschere in gel o in fogli posizionate sugli occhi chiusi per fornire effetti rinfrescanti, lenitivi e

idratanti e per aiutare a ridurre le borse, alleviare gli occhi stanchi e migliorare l'aspetto delle occhiaie.

Vista questa moltitudine di prodotti è naturale che il loro mercato e la loro richiesta sia sempre più in rapida espansione, ritagliandosi una fetta sempre più grande nel mercato globale.

1.1.2. Il mercato globale della cura personale

Il mercato globale dell'industria dei prodotti per la cura della persona ammonta a diverse centinaia di miliardi di dollari (Figura 1). Nel 2022 solamente l'industria della cosmetica ha fatturato a livello mondiale oltre 525 miliardi di dollari, con una crescita rispetto all'anno prima del 15%, e si prevede che la cura della pelle genererà cifre fino ad oltre 600 miliardi entro il 2028 (Mordor Intelligence Research & Advisory, 2023). La quota di mercato maggiore per i prodotti di bellezza e per la cura della persona è detenuta dall'Asia settentrionale, che rappresenta oltre un terzo del mercato. Segue il Nord America con circa il 26% e l'Europa con il 22% (Cosmetica Italia, 2023).



Figura 1: Mercato globale in %, 2022 di prodotti di bellezza e di cura della persona (Mordor Intelligence, 2023).

La regione Asia-Pacifico sta registrando la crescita più rapida, tra cui Cina, India, Giappone, Indonesia e Vietnam, che offrono notevoli opportunità di crescita agli operatori del mercato. Ciò è dovuto alla crescente domanda di cosmetici, che molte persone

sfruttano nella loro routine quotidiana di cura del corpo. La necessità di prodotti multifunzionali sta stimolando l'innovazione nel settore. Negli ultimi anni è aumentata la tendenza degli influencer sui social media a mostrare i loro regimi di bellezza, offrendo così visibilità a marchi e prodotti nello specifico. Di conseguenza, le aziende di bellezza locali e internazionali cercano di collaborare con queste figure. Il mercato globale della bellezza e della cura della persona è altamente competitivo, la cui domanda è guidata dall'adattamento alle routine di bellezza e ad una maggiore consapevolezza degli ingredienti usati.

Il mercato dei prodotti di bellezza e cura personale è segmentato per tipo di prodotto, categoria, canale di distribuzione e area geografica. Per tipologia di prodotto, il mercato è a sua volta segmentato in prodotti per la cura personale e prodotti cosmetici e per il trucco.

1.1.3. Il mercato Europeo e Italiano

L'andamento dei consumatori verso il mantenimento di uno stile di vita di maggiore qualità ha reso l'Europa un mercato con grandi potenziali per promuovere le innovazioni nel settore. Inoltre, è sempre più in crescita la domanda dei consumatori europei per articoli realizzati con componenti naturali e innovativi. Questo cambiamento può essere associato al fatto che i consumatori oggi stanno acquisendo una maggiore consapevolezza degli ingredienti usati, evitando intenzionalmente i prodotti a base chimica, come i solfati e i parabeni, o ad alto impatto ambientale.

L'aumentata consapevolezza dei consumatori riguardo ai prodotti per la cura della persona ha portato a un incremento significativo della domanda per questi ultimi. Questa crescita è guidata da diversi fattori, tra cui una maggiore attenzione al benessere personale, l'importanza crescente attribuita agli ingredienti naturali e sostenibili e l'influenza delle tendenze sociali che promuovono uno stile di vita più sano. Di conseguenza, le aziende del settore stanno innovando e ampliando le loro linee di prodotti per rispondere alle nuove esigenze del mercato, offrendo soluzioni più mirate e personalizzate. Le aziende così, si rivolgono ai consumatori attraverso i più vari canali di distribuzione, tra cui i media online e sociali, i supermercati/ipermercati, i minimarket e

altri. Gli acquisti online si stanno espandendo al di là del desktop di un pc, con gli operatori dei supermercati che lanciano app per i consumatori più giovani e più impegnati. Inoltre, i produttori stanno capitalizzando le piattaforme online vendendo i loro prodotti attraverso i propri siti web e inserendoli nei più popolari siti di vendita al dettaglio online, con l'obiettivo di migliorare la visibilità e la portata del marchio. La crescente attenzione alle abitudini di cura e alla percezione di sé tra gli adulti emergenti, in particolare la Generazione Z e i Millennials (35 e 36% rispettivamente della quota di mercato (Medihair, 2024)), è un fattore chiave della domanda di prodotti di bellezza e cura personale in Europa. La Germania rappresenta il mercato più grande per i prodotti di bellezza e cura personale in Europa, seguita da Francia e Regno Unito. Il fatturato più elevato si osserva nelle categorie dei prodotti per la cura dei capelli, della pelle e del viso. In Italia si prevede che il mercato della bellezza e della cura della persona crescerà da 10,42 miliardi di dollari nel 2023 a 12,10 miliardi di dollari nel 2028. Ad esempio, l'aumento del numero di problemi dentali tra i bambini e gli adulti, dovuto a cattive abitudini alimentari, e la crescente popolarità dei prodotti per l'igiene orale a base di erbe stanno guidando il mercato dei prodotti per l'igiene orale in Italia. Inoltre, l'aumento dei prezzi e la domanda dei consumatori di soluzioni più mirate stanno accelerando la crescita del mercato. La crescente consapevolezza della salute orale ha aiutato i distributori a introdurre nuove categorie di prodotti per l'igiene orale, come i prodotti per lo sbiancamento dei denti. Il miglioramento della qualità della vita, l'impatto positivo della bellezza e della cura della persona sull'autostima e sull'interazione sociale e il graduale spostamento dei consumatori verso marchi di cosmetici di lusso e di fascia alta sono alcuni dei fattori che si prevede guideranno il mercato nel lungo periodo. Inoltre, i consumatori italiani sono molto attratti dai cosmetici e dai prodotti di bellezza. La domanda di creme per il viso e di cosmetici biologici è aumentata negli ultimi anni a causa dei problemi di sensibilità della pelle e dei cambiamenti ambientali. Il numero di giovani nella regione sta sempre più guidando il mercato dei cosmetici. Gli operatori del mercato stanno introducendo tecnologie innovative per trovare prodotti di bellezza personalizzati per i consumatori, come il lancio di consigli per la cura della pelle che utilizzano l'intelligenza artificiale (IA), o figure istruite ad hoc. L'IA di uno strumento digitale che ha lo scopo di aiutare i consumatori a scegliere i prodotti più adatti e di educarli alla protezione.

In molti Paesi, tra cui l'Italia, i cosmetici e i prodotti per la cura della persona sono venduti essenzialmente in farmacia e nei negozi specializzati. È stata osservata una maggiore presenza di prodotti naturali e biologici nelle farmacie e nei drugstore, con il risultato che gli acquirenti sono diventati sempre più incuriositi per queste etichette, scoprendone i benefici e quindi più aperti a provare questi prodotti. Le farmacie offrono una varietà di opzioni con più caratteristiche chiave per i prodotti di bellezza e per la cura della persona, il che le ha rese uno dei canali più importanti per la vendita di questi prodotti in Italia. Alcune creme anti-età, saponi, talchi e altri prodotti per l'igiene sono disponibili solo nelle farmacie e nei negozi specializzati e sono quindi venduti solo attraverso questi esercenti. Il mercato della bellezza e della cura della persona in Italia è un mercato altamente competitivo, grazie alla presenza di numerosi operatori regionali e private label e di giganti globali (Figura 2 a e b).

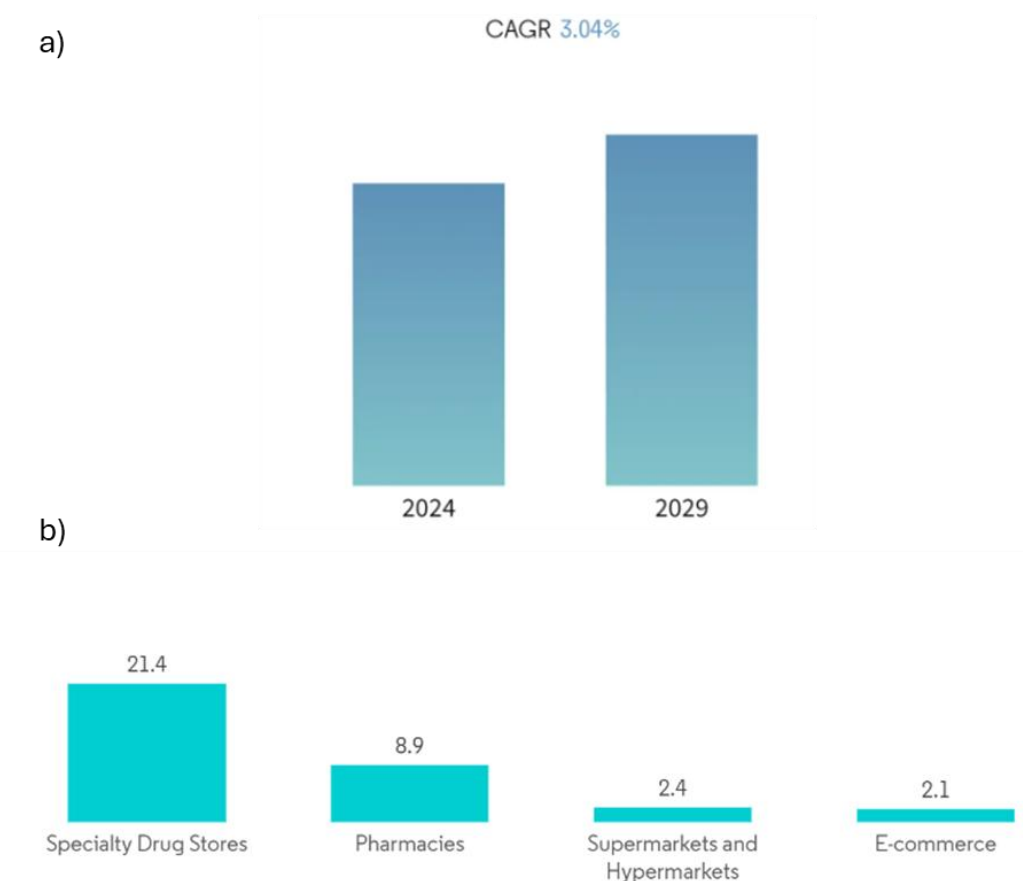


Figura 2: a) statistica mercato italiano di prodotti per il beauty e la cura personale (Mordor Intelligence, 2024); b) canali di distribuzione nel mercato italiano di prodotti per il beauty e la cura della persona (Mordor Intelligence, 2024).

1.1.4. Come la pandemia da COVID-19 ha modificato la cura della persona

Nel corso degli ultimi anni, si sono verificate diverse tipologie di crisi in un breve lasso di tempo. Si è passati dalla pandemia alla crisi finanziaria, economica e ai rincari delle materie prime, fino allo scoppio della guerra tra Russia e Ucraina, che continua a influenzare la situazione attuale. La pandemia da COVID-19 ha avuto un impatto significativo sul settore della cura personale, portando a cambiamenti che potrebbero perdurare nel tempo, spingendo il settore ad evolversi, adattandosi a nuove esigenze di mercato. Durante la pandemia, il 22% delle donne ha dedicato più tempo e risorse alla cura della propria pelle, lasciando da parte il trucco. Sempre più donne sono consapevoli dell'importanza di una pelle sana e ben curata. Inoltre, se prima la stragrande maggioranza preferiva acquistare i propri prodotti in negozi, dall'avvento della pandemia con la conseguente chiusura di esercizi commerciali e l'obbligo di rimanere nelle proprie case, ha portato ad un aumento dei canali di e-commerce online (Figura 3) (Statista).

Categorie	Quota degli acquirenti online	Var. punti % media annuale 2017- 2022
Prodotti per la cura dei capelli	16,2%	0,9%
Prodotti per la cura del viso	15,9%	0,5%
Prodotti per l'igiene della persona	15,7%	0,9%
Profumi	14,9%	0,1%
Prodotti per la cura del corpo	14,5%	0,6%
Dentifrici e colluttori	13,6%	1,1%
Prodotti per il trucco di viso	13,0%	0,1%
Prodotti per lo styling	9,7%	0,3%
Prodotti per il trucco delle mani	8,8%	0,1%
Crema solari	8,4%	0,1%
Prodotti per la colorazione dei capelli	7,4%	0,2%

Figura 3: Acquisto di cosmetici online nell'ultimo quinquennio (Cosmetica Italia, 2023).

L'industria cosmetica ha affrontato le sfide delle crisi globali in vari modi (Confcommercio), tra cui:

- **Innovazione e adattamento dei prodotti:** Le aziende cosmetiche hanno cercato di sviluppare nuovi prodotti o adattare quelli esistenti per soddisfare le

esigenze dei consumatori durante la pandemia. Ad esempio, sono stati lanciati prodotti per la cura della pelle legati all'uso frequente di dispositivi di protezione individuale (mascherine di diversa tipologia) e alla necessità di idratazione.

- **Cambiamenti nella catena di approvvigionamento:** L'industria cosmetica ha dovuto affrontare interruzioni nella catena di approvvigionamento diretta a causa delle restrizioni di viaggio e delle chiusure di fabbriche. Molte aziende hanno cercato di diversificare le fonti di approvvigionamento e di ridurre la dipendenza da un singolo fornitore.
- **Focus sul digitale:** Con la chiusura dei negozi fisici o con limitazioni, le aziende cosmetiche hanno dovuto investire maggiormente nel commercio elettronico e nelle strategie di marketing online. Hanno migliorato di conseguenza i loro siti web, creato contenuti coinvolgenti sui social media e offerto consulenza virtuale ai clienti.
- **Sostenibilità:** L'attenzione verso la sostenibilità è aumentata durante la pandemia. Le aziende cosmetiche hanno cercato di ridurre l'impatto ambientale dei loro prodotti e di promuovere pratiche più sostenibili.
- **Adattamento alle nuove esigenze dei consumatori:** L'industria cosmetica ha riconosciuto che le priorità dei consumatori stavano cambiando. Le aziende hanno quindi cercato di rispondere alle nuove esigenze, come la richiesta di prodotti per la cura della pelle e del corpo che favoriscano il benessere e la salute.

1.2. Formulazione e Additivi

Una formulazione cosmetica è una miscela di ingredienti formulata per poter essere applicata sul corpo al fine di migliorarne l'aspetto, pulirlo, o modificarne l'aspetto esterno senza però alterare le sue funzioni. Possono variare a seconda del tipo di prodotto e la funzione che veicola. Solitamente in una formulazione abbiamo sempre 1 o più ingredienti attivi, cioè, composti che forniscono direttamente l'effetto desiderato, che può essere ad esempio idratazione, anti-aging o protezione dal sole. Vi sono poi gli

ingredienti coadiuvanti che sono responsabili delle caratteristiche fisiche del prodotto, quali emollienti, tensioattivi, emulsionanti e i conservanti.

- Gli emollienti migliorano la consistenza del prodotto e possono aumentarne il potere idratante.
- I tensioattivi aiutano nella formulazione di schiume e sono presenti nei detergenti. Hanno un potere lavante, schiumogeno e favoriscono le emulsioni acqua/olio. Presentano una testa idrofila o polare e una coda lipofila o apolare. Presentano diverse caratteristiche chimico/fisiche che ci permette di dividerli in quattro categorie:
 - Anionici: dispongono di cariche negative, aumentano il pH e hanno un elevato potere sgrassante e pulente;
 - Non ionici: sono meno schiumogeni e aggressivi sulla pelle, hanno principalmente una funzione di emulsionanti o solubilizzanti per altri ingredienti;
 - Cationici: presentano cariche positive, usati nella formulazione di balsami;
 - Anfoteri: sono meno aggressivi degli anionici in quanto formulati con betainici e imidazolinici, hanno proprietà detergenti e schiumogene.
- Gli emulsionanti aiutano la miscellanea tra olio e acqua.
- I conservanti prevengono la crescita microbica e quindi prolungano la durata del prodotto.
- Stabilizzanti, anch'essi aiutano a prolungare la durata del prodotto.

Altri ingredienti possono essere aggiunti per migliorare l'aspetto o gli attributi sensoriali della formulazione, come profumi, coloranti.

Tutti questi componenti devono essere sicuri per il consumatore, questa è la missione primaria di enti regolatori come la Food and Drug Administration (FDA) negli Stati Uniti e della Commissione Europea. La regolamentazione delle sostanze che possono essere usate come ingredienti nella formulazione di un cosmetico viene disciplinata dal Regolamento (CE) n. 1223/2009 in Europa, entrato in vigore in tutti gli Stati membri nel 2013, che regola sia l'elenco delle sostanze vietate sia quelle delle sostanze ammesse ma con specifiche limitazioni e restrizione d'uso. Inoltre, il Comitato Scientifico per la Sicurezza dei Consumatori (SCCS, Scientific Committee on Consumer Safety)

valuta costantemente i rischi (chimici, fisici, biologici, meccanici, ecc) per la salute e la sicurezza dei prodotti di consumo (UNION P., (2009).

1.3. Aspetti normativi sui contaminanti

Il Regolamento (CE) n. 1223/2009 a livello Europeo, ha stabilito regole, per la produzione, valutazione, rintracciabilità e controllo degli effetti avversi nei cosmetici. Nell'ambito della vigilanza di eventuali effetti indesiderati, il Ministero della Salute ha istituito la “cosmetovigilanza”, che procede alla raccolta, valutazione e diffusione di eventuali segnalazioni di effetti indesiderabili. Il Regolamento presenta dieci allegati:

- **Allegato I** – Relazione sulla sicurezza del prodotto cosmetico;
- **Allegato II** – Elenco delle sostanze vietate nei prodotti cosmetici;
- **Allegato III** – Elenco delle sostanze il cui uso è vietato nei prodotti cosmetici, salvo entro determinati limiti;
- **Allegato IV** – Elenco dei coloranti che possono essere contenuti nei prodotti cosmetici;
- **Allegato V** – Elenco dei conservanti autorizzati nei prodotti cosmetici;
- **Allegato VI** – Elenco dei filtri UV autorizzati nei prodotti cosmetici;
- **Allegato VII** – Simboli impiegati sull'imballaggio/sul recipiente;
- **Allegato VIII** – Elenco dei metodi convalidati alternativi alla sperimentazione animale;
- **Allegato IX**
 - Parte A (Direttiva abrogata e sue modifiche successive);
 - Parte B (Elenco dei termini di recepimento nel diritto nazionale e di applicazione);
- **Allegato X** – Tavola di concordanza.

Il regolamento stabilisce diverse disposizioni per garantire la sicurezza e la conformità dei prodotti, tramite la valutazione di prodotti “borderline”; stabilire una Persona responsabile per ogni prodotto; definire gli obblighi dei distributori; norme di buona

fabbricazione; documentazione; notifiche alla Commissione europea; norme per l'uso di nanomateriali; modifiche alle sostanze classificate come cancerogene, mutagene o tossiche per la riproduzione; divieti e sperimentazione animale; glossario degli ingredienti.

Inoltre, i prodotti cosmetici e in generale tutti i prodotti per la cura della persona, possono essere un buon substrato per la crescita di microorganismi. La sicurezza e la qualità microbiologica sono strettamente legate. Se la qualità microbiologica non è garantita, la sicurezza del prodotto stesso ne risulta compromessa. Pertanto, il Regolamento Europeo 1223/2009 e le norme ISO richiedono che nella valutazione della sicurezza di ogni cosmetico si tenga conto anche della sua qualità microbiologica. In quanto, la presenza di contaminanti microbiologici può influenzare negativamente la sicurezza e l'efficacia del prodotto. Il documento dell'SCCS "The SCCS notes of guidance for the testing of Cosmetic ingredients and their safety Evaluation", valuta che per definire la qualità di un prodotto è necessario eseguire analisi microbiologiche di routine su ogni lotto di prodotto, ne fanno eccezione i prodotti presenti nella ISO 29621 che hanno un rischio microbiologico basso. Vengono inoltre riportati i limiti quantitativi accettabili di microrganismi mesofili aerobi che possono essere presenti in un cosmetico e le specie microbiche che non devono essere presenti. Si richiede per i prodotti per bambini, quelli destinati alle mucose o contorno occhi, e altri prodotti vi sia assenza di *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* e *C.albicans*. Altri gram-negativi di interesse cosmetico possono essere il *Pluralibacter gergoviae* (*Enterobacter gergoviae*), e *Burkholderia cepacia*. Infine, anche *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter* sono patogeni opportunisti da monitorare, in quanto possono essere indice di scarsa igiene a livello industriale.

1.4. Quali sono gli ingredienti proibiti nei cosmetici?

L'Allegato II del Regolamento 1223/2009/CE sui prodotti cosmetici, modificato dal Regolamento (UE) 2024/996, del 4 aprile 2024, contiene una lista di 2528 sostanze / entità uniche che sono state bandite nella produzione di qualsiasi cosmetico commercializzati per la vendita o l'uso nell'Unione Europea. Una delle sostanze vietate nei cosmetici, ad esempio, è il butylphenyl methylpropional (BMHCA), noto anche come Lilial, fragranza ampiamente usata fino al 2022 nei prodotti come shampoo, docciaschiuma e deodoranti. Rientrano nella lista alcune sostanze per/poli-fluoroalchiliche come l'acido Perfluoroheptanoico (PFHxA) e i suoi sali, l'acido Perfluorononanoico (PFNA) e i suoi sali, l'acido Perfluoroottanosulfonico (PFOS) e i suoi sali e l'acido Perfluoroottanoico (PFOA) e i suoi sali; molti ftalati (sostanze chimiche organiche che derivano dal petrolio impiegate come agenti plastificanti ma anche come solventi e ottimizzatori della consistenza e resa di diversi prodotti) come il Benzyl butil ftalato (BBP), Di(2-etilesil) ftalato (DEHP) e il Dimetil tereftalato (DMT) ; il Bisfenolo A e S (impiegati principalmente nella produzione delle plastiche in policarbonato e molto diffuse per le proprietà di trasparenza, resistenza termica e meccanica) come espresso nel Regolamento (CE) n. 1223/2009 e nel Regolamento (EU) 2024/3190 della Commissione.

Negli Stati Uniti la Food and Drug Administration (FDA) ha emendato che i prodotti e gli ingredienti cosmetici, ad eccezione di additivi coloranti, non necessitano dell'approvazione della FDA prima di essere immessi sul mercato.

Gli ingredienti che sono vietati o il cui uso ne è limitato in America sono:

- Bithionol
- Propellenti a base di clorofluorocarburi
- Cloroformio
- Salicilanilidi alogenati
- Esaclorofene
- Composti del mercurio
- Cloruro di metilene
- Materiali bovini vietati
- Cloruro di vinile

➤ Complessi contenenti zirconio

Al contrario gli additivi coloranti sono ammessi nei cosmetici solo se approvati dalla FDA per l'uso previsto. Inoltre, alcuni possono essere utilizzati solo se provengono da lotti testati e certificati dall'FDA. Inoltre, secondo la legge statunitense, la FDA non ha l'autorità di richiedere ai produttori di cosmetici di presentare alla FDA i propri dati sulla sicurezza e l'onere di dimostrare che un particolare prodotto o ingrediente è dannoso se usato come previsto è a carico della FDA.

Questa è una limitatezza da parte degli Stati Uniti sul fronte legislativo; infatti, sono ammessi molti più prodotti che al contrario l'Europa ha bandito o limitato l'uso, garantendo così più alti standard di sicurezza ambientale e umana.

1.5. Tossicologia (*in vitro* e *in vivo*)

La tossicologia è quella branca della farmacologia che studia sintomi, meccanismo e trattamenti di persone e animali avvelenati ad opera di composti più svariati. Il parametro principale per determinare se una sostanza è tossica è la dose: quasi tutte le sostanze possono essere tossiche in determinate dosi. Paracelso riassume questo concetto con una frase: “*Omnia venenum sunt nec sine veneno quicquam existit. Dosis sola facit ut venenum non fit*”. La tossicologia si occupa così di studiare l'effetto che può essere diretto o indiretto delle sostanze coinvolte nell'intossicazione e dei processi enzimatici alla base del loro metabolismo. L'entità del danno causato dalla sostanza potenzialmente tossica è legata a diversi fattori, tra cui: la natura chimica della sostanza, le modalità di assorbimento, la sua concentrazione, la durata di esposizione, stato di salute del soggetto esposto e fattori genetici del soggetto. Vi sono diversi indici tossicologici che forniscono un'indicazione, ad esempio, della concentrazione di una sostanza in corrispondenza della quale si manifestano effetti tossici.

- DL50 (Dose Letale): dose letale media, dose della sostanza in grado di uccidere il 50% di una popolazione di campione, espressa generalmente in mg/kg;
- CL50 (Concentrazione Letale): concentrazione letale media;
- CE50 (Concentrazione effettiva): concentrazione effettiva media;
- CI50 (Concentrazione Inibente): concentrazione inibente media;

- VLS (Valore Limite Soglia): valore limite di soglia, concentrazione di sostanza al di sotto della quale "quasi tutte" i soggetti esposti non corrono alcun rischio;
- NOAEL (No Observable Adverse Effect Level): quantità di sostanza presunta tossica con la quale non sono stati provati effetti dannosi; dalla NOAEL è ricavabile la dose giornaliera accettabile;
- NOEC (No Observed Effect Concentration): concentrazione senza effetti osservabili.

Inoltre, l'esigenza di ridurre l'impiego di modelli sperimentali animali (*in vivo*) e la necessità di sviluppare modelli alternativi, ha portato all'uso di modelli *in vitro*, utilizzando colonie batteriche o singole linee cellulari come le staminali embrionali. Nel 2016, sono state apportate modifiche agli Allegati VII e VIII del Regolamento REACH (CE) n. 1907/2006, per quanto concerne le modifiche riguardanti la sperimentazione *in vitro* per alcune proprietà tossicologiche (Regulation (EC) N. 1907/2006). I sistemi in-vitro coinvolgono substrati naturali (colture cellulari, pelle) ricostituiti (epidermide) o artificiali come (vetro, lastre di quarzo). La sperimentazione *in vitro* offre diversi vantaggi durante la fase sperimentale, rispetto ai tradizionali test su animali/ *in vivo*:

- **Etica e benessere degli animali:** l'approccio *in vitro* riduce la necessità di utilizzare animali per la ricerca. Più etico e rispettoso nei confronti degli animali.
- **Riproducibilità e controllo:** I test *in vitro* possono essere ripetuti più facilmente e consentono un maggiore controllo delle condizioni sperimentali. Ciò riduce la variabilità dei risultati.
- **Costi e tempi:** La sperimentazione *in vitro* è spesso più economica e veloce rispetto ai test su animali. Non richiede strutture complesse o cure per gli animali.
- **Rilevanza umana:** I test *in vitro* utilizzano cellule umane o tessuti, rendendoli più direttamente rilevanti per la salute umana. Ciò migliora la predittività dei risultati.
- **Applicazione su larga scala:** I metodi *in vitro* possono essere automatizzati e adattati per testare un gran numero di sostanze chimiche o farmaci contemporaneamente.

Tuttavia, è importante sottolineare che la sperimentazione *in vitro* ha anche limitazioni, come la mancanza di interazioni complesse tra organi e sistemi. Pertanto, spesso si utilizza una combinazione di test *in vitro* e *in vivo* per ottenere una valutazione completa

della sicurezza e dell'efficacia di una sostanza. Un'altra alternativa, secondo il Regolamento (UE) n. 1223/2009 un metodo alternativo può essere l'*ex vivo* che si riferisce alla sperimentazione effettuata su tessuti di un organismo con la minima alterazione delle condizioni naturali. Questa tecnica può comprendere studi su ciocche di capelli, biopsie cutanee, ecc. Gli espianti di pelle umana viva *ex vivo*, ad esempio, consentono di valutare l'efficacia di una formulazione, di un principio attivo o di un dispositivo in condizioni che si avvicinano il più possibile alla realtà, in quanto la pelle espiantata presenta morfologia, fisiologia, struttura, barriera e metabolismo normali.

Il modello *ex vivo* inoltre consente di riprodurre numerose sollecitazioni esterne: esposizione alla luce (UVA, UVB, IR) o all'inquinamento (urbano, atmosferico, esterno, interno), aggressioni chimiche (SDS, allergeni) o meccaniche (stripping), temperatura (alta, bassa, umidità), ferita, ustione, sensibilizzazione, rimozione dei peli, batteri patogeni, ecc. I modelli possono essere i più differenti: Pelle intera, Epidermide + Derma, Strato corneo separato, Ipoderma, Peli isolati, Espianti del cuoio capelluto, Simile alla psoriasi, Pelle con microbiota cutaneo, Pelle infiammata. Il modello *ex vivo* permette di lavorare in condizioni molto vicine alla fisiologia reale della pelle umana, di scegliere il fototipo, l'età e il sesso del donatore di pelle e di osservare rapidamente gli effetti del prodotto sulla pelle prima degli studi *in vivo*.

2. Obiettivi del progetto

Questo progetto di dottorato, nell'ambito del Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005), risorse FSE REACT-EU, Azione IV.4 “Dottorati e contratti di ricerca su tematiche dell’innovazione”, mira a valutare gli effetti dei contaminanti organici presenti nei prodotti per la cura della persona su modelli sperimentali acquatici invertebrati, come il *Mytilus galloprovincialis*, e su altre specie acquatiche, come il *Sander lucioperca*. I contaminanti organici sono una vasta categoria di composti che attualmente sono onnipresenti nei nostri ecosistemi acquatici e terrestri. Esiste pertanto il rischio che questi inquinanti subiscano un processo di biomagnificazione, cioè l'accumulo di sostanze tossiche negli esseri viventi che aumenta lungo la catena trofica, risultando in una concentrazione maggiore nei predatori rispetto alle prede.

L'accumulo di questi inquinanti nei tessuti può causare un abbassamento delle difese immunitarie, squilibri ormonali e altre patologie che compromettono la sopravvivenza degli organismi marini e l'equilibrio dell'intero ecosistema. Inoltre, questi composti possono influenzare direttamente e indirettamente l'uomo, non solo attraverso l'esposizione diretta ma anche tramite l'alimentazione di queste specie ittiche.

I molluschi bivalvi sono tra le specie più abbondanti negli ecosistemi acquatici di tutto il mondo e hanno un'importanza sia ecologica che economica. Questi organismi filtratori si nutrono di alghe, plancton e limo e, tramite la filtrazione dell'acqua, aiutano a purificare il sistema acquatico in cui vivono. Grazie alle loro caratteristiche uniche, sono utilizzati come bioindicatori della salute delle acque, poiché la loro abbondanza e capacità riproduttiva indicano un sistema idrico sano. Accumulando nel loro organismo sostanze di varia natura, comprese quelle tossiche, contribuiscono così a monitorare la qualità dell'acqua. Per la loro elevata sensibilità alle alterazioni dell'habitat, sono utilizzati come specie target per la determinazione e l'aggiornamento delle soglie legislative.

Per quanto riguarda l'assunzione tramite la dieta, sappiamo che il pesce e i frutti di mare sono i principali responsabili dell'esposizione ai contaminanti organici, in particolare ai PFAS.

In generale, i benefici per la salute associati al consumo di pesce sono ritenuti superiori ai rischi legati alla potenziale esposizione a determinati inquinanti ambientali. La maggior parte degli studi che valutano questi rischi si basa su analisi di specie ittiche marine e le sostanze PFAS non sono tra i contaminanti comunemente trattati. Dal punto di vista della sicurezza alimentare, i PFAS possono quindi essere considerati contaminanti di interesse emergente, anche se l'uso di alcuni PFAS è stato limitato nel corso degli anni.

Inoltre, i frutti di mare tra cui rientrano i mitili e i pesci d'acqua dolce, come il luccio, rappresentano una parte importante nell'economia e nella alimentazione.

Il progetto, nel suo insieme, mira a studiare e valutare, attraverso un approccio multidisciplinare, le risposte di questi organismi a diversi contaminanti organici, spesso presenti e di conseguenza rilasciati dai prodotti per la cura personale, presenti così nelle acque. Questo sarà fatto mediante studi sia *in vivo* che *in vitro*. La valutazione considera i livelli di contaminazione ambientale attualmente presenti a livello globale e in particolare europeo e la loro conseguente influenza all'interno della catena alimentare. Dai dati ottenuti emerge la necessità di un monitoraggio continuo dei livelli di contaminazione, attraverso la valutazione del grado di bioaccumulo e delle risposte fisiologiche di questi organismi esposti.

Alla luce di quanto appena espresso, lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare diversi contaminanti organici (plastificanti, bisfenoli, sostanze poli- e perfluoroalchiliche, pesticidi, farmaci, tensioattivi, conservanti ad attività antimicrobica) negli organismi acquatici, e di conseguenza sull'uomo, in quanto essere in cima alla catena alimentare e direttamente coinvolto negli effetti potenzialmente nocivi di queste sostanze. E cercare inoltre di trovare alternative e composti che in co-presenza alle sostanze potenzialmente dannose per gli organismi ne riducano il loro potere tossico.

Ciò è stato possibile tramite l'utilizzo di differenti tecniche:

- Gascromatografia accoppiata ad uno spettrometro di massa (GC-MS) per la determinazione della quantità nominale nell'organismo target e nelle acque dei contaminanti.
- Cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata ad uno spettrometro di massa (HPLC-MS) per la determinazione della quantità nominale nell'organismo target e nelle acque dei contaminanti.

- Valutazione della vitalità cellulare in *Mytilus galloprovincialis* tramite test colorimetrici, quali il saggio di ritenzione del Rosso Neutro e il metodo di esclusione del Trypan Blue.
- Valutazione della attività fagocitaria in *Mytilus galloprovincialis* tramite test colorimetrico con Gimsa.
- Valutazione della capacità di Regolazione del Volume cellulare in *Mytilus galloprovincialis* tramite microscopia ottica.
- Analisi delle placche abissali in *Mytilus galloprovincialis*.
- Determinazione dei valori nutrizionali, tramite valutazione del contenuto lipidico e della composizione in acidi grassi, delle proteine totali, contenuto di carotenoidi e tocoferoli in *Mytilus galloprovincialis*.
- Valutazione del grado di Bioaccumulo del contaminante in *Mytilus galloprovincialis*.

3. Contaminanti Organici

3.1. Effetti del plastificante non-ftalico DEHT sulla specie *Mytilus galloprovincialis*

3.1.1. Premesse

A seguito dell'accelerazione dello sviluppo industriale e dell'aumento della produzione e dello smaltimento delle materie plastiche, negli ultimi decenni l'inquinamento da plastica è divenuto un problema universalmente pressante, che ha attirato l'attenzione di enti governativi, della comunità scientifica e, non da ultimo, della società civile. Infatti, accanto alla dimensione globale dell'inquinamento da plastica determinata dalla progettazione di prodotti, dalla gestione dei rifiuti e dai problemi strutturali (Barrowclough e Birkbeck, 2022), altre questioni ambientali e di salute pubblica su larga scala, come il cambiamento climatico (Shen et al., 2020) e la diffusione della resistenza agli antibiotici e degli agenti patogeni per l'uomo (Bank et al., 2020; Arrigo et al., 2023), sono inestricabilmente legate, e quindi potenzialmente esacerbate dalla cattiva gestione dell'inquinamento da plastiche. Nonostante i recenti e numerosi sforzi da parte di governi, imprese e società per sostenere la riduzione della plastica e gli approcci ad una economia circolare, è probabile che la portata dell'inquinamento da plastiche sia destinata ad aumentare nei prossimi decenni, a causa del previsto aumento della popolazione umana e del consumo di prodotti in plastica (Lau et al., 2020).

È noto che i polimeri di plastica sono suscettibili alla degradazione sia abiotica che biotica (Gewert et al., 2015). Di conseguenza, dai pezzi di plastiche madri possono formarsi nanoplastiche (<100 nm), microplastiche (<5 mm), mesoplastiche (5-25 mm) e macroplastiche (>25 mm), tutte ormai ubiquitarie a livello globale (Stock et al., 2019). Tuttavia, con l'invecchiamento della plastica nell'ambiente, i rischi per la salute e l'ecologia non derivano solo dalla generazione di frammenti di plastica di varie dimensioni, che possono fungere da vettori per molti altri inquinanti ambientali (Wang e Wang, 2018; Ateia et al., 2020), ma anche dal rilascio di sostanze chimiche attraverso la lisciviazione o la degradazione del polimero plastico stesso (Gewert et al., 2015). Durante la produzione, infatti, un'ampia varietà di additivi chimici viene incorporata nei polimeri

plastici per conferire loro specifiche proprietà funzionali, quali flessibilità, lavorabilità, resistenza agli agenti atmosferici, stabilità al calore e alla luce, ecc. (Yan et al., 2021; Schrank et al., 2019). Questi additivi, non essendo legati in modo covalente al polimero, possono essere rilasciati nell'ambiente tramite impianti di trattamento delle acque reflue, deflusso, drenaggio e deposizione atmosferica (Karbalaei et al., 2018; Beltifa et al., 2017; Liu et al., 2020).

I plastificanti, come gli ftalati che sono esteri dell'acido ftalico (PAE, Phthalic Acid Esters) e i plastificanti non ftalati (NPP, Non-phthalic plasticizers), sono tra gli additivi più comuni rilevati nei detriti di plastica raccolti in vari comparti ambientali (Net et al., 2015; Xie et al., 2005, 2007). I PAE sono tipicamente utilizzati come additivi nei prodotti in PVC e possono rappresentare fino al 60% del peso del prodotto (Arbeitsgemeinschaft & Umwelt, 2006). Come molti altri additivi, spesso non sono chimicamente legati alla struttura del polimero e hanno quindi una più alta probabilità di essere rilasciati nell'ambiente, mettendo così in pericolo la salute del biota, interferendo principalmente con il sistema endocrino (Engler, 2012; Net et al., 2015; Mankidy et al., 2013; Sedha et al., 2021).

Gli esteri dell'acido ftalico, come il dibutilftalato (DBP), il diisobutilftalato (DIBP), il di (2-etilesile) ftalato (DEHP), n-butilbenzilftalato (BBP), sono stati identificati come sostanze estremamente preoccupanti, caratterizzate da proprietà di interferenza con il sistema endocrino e dagli effetti tossici sulla riproduzione (sostanze chimiche di categoria 1 B, Regolamento (CE) n. 1907/2006), e di conseguenza sono state rigorosamente regolamentate per la produzione e l'uso dall'UE (European Union, 2013; European Commission, 2007; European Commission, 2006). Nell'ultimo mezzo secolo, i produttori si sono orientati verso la produzione e l'uso di plastificanti non-ftalati per superare i problemi legislativi e di sicurezza legati ai PAE. Fin dall'inizio, gli NPP, che comprendono principalmente tereftalati, sebacati, benzoati e adipati, sono sembrati una buona alternativa ai PAE, grazie ai tassi di lisciviazione più bassi e all'assenza di restrizioni d'uso nei prodotti in PVC (Jebara et al., 2021; Coltro et al., 2013). Basti pensare che, in concomitanza con il declino della quota di mercato dei PAE, il DEHP ha subito un calo del 32% nel consumo dell'UE tra il 1999 e il 2014 (Cadogan et al., 2007; ECPI, 2018), così che gli NPP hanno rappresentato circa il 12% e il 35% del consumo mondiale di plastificanti tra il 2005 e 2017, e ora rappresentano il 40% del mercato dei plastificanti dell'UE (Plastic

Technology, 2016 ECPI). Nello stesso mercato, i tereftalati, il cui principale rappresentante è il DEHT, presentano una quota del 12%, poiché sono sempre più utilizzati come alternativa commerciale in un'ampia gamma di applicazioni, come nei giocattoli di plastica e negli articoli per l'infanzia, nelle pellicole, nei prodotti in vinile e tappi per bevande (ECPI, 2019).

Le conoscenze sulle proprietà fisico-chimiche dei NPP e sulla loro tossicità per l'uomo e l'ambiente sono ancora limitate e frammentarie (Bui et al., 2016; Burgos-Aceves et al., 2021). In alcuni casi esistono somiglianze fisico-chimiche tra i PAE e le loro alternative. Ad esempio, il DEHT è l'isomero strutturale del DEHP ed è caratterizzato da un'idrofobicità e una solubilità in acqua simili. Inoltre, è possibile confermare un potenziale tossico inferiore e l'assenza di effetti tossici di categoria 1b. Tuttavia, altri effetti non standard, come la tossicità nello sviluppo precoce o l'alterazione del sistema endocrino, dovrebbero essere presi in considerazione (Bui et al., 2016). Sebbene gli NPP non presentino in generale le caratteristiche di una sostanza chimica persistente, è probabile che possano essere presenti negli ecosistemi, a causa della loro continua produzione e rilascio nell'ambiente circostante, determinando così una continua esposizione ambientale e umana (Jebara et al., 2021).

Le principali interfacce terra-acqua, come le zone costiere, i fiumi, i laghi, gli estuari, le acque interne, le lagune e le zone umide, sono sempre state considerate un nesso complesso e dinamico per l'inquinamento da materiale plastico, in quanto rappresentano habitat spesso densamente popolati, con importanti fonti di inquinamento di conseguenza (Lee et al., 2020; Kasavan et al., 2021; Gokul et al., 2023). Negli ambienti acquatici, è stato riportato che gli organismi a ogni livello della catena alimentare assorbono e bioaccumulano detriti di plastica (Mcneish et al., 2018; Carson et al., 2013; Zicarelli et al., 2023; Pastorino et al., 2023; Savuca et al., 2022; Nelms et al., 2019). Di conseguenza, la complessa serie di contaminanti idrofobici a cui è associata la plastica potrebbe trasferirsi agli organismi attraverso l'ingestione diretta di detriti di plastica o il bioaccumulo indiretto (bioconcentrazione dall'acqua) di sostanze chimiche liscivate dalle microplastiche (Càssio et al., 2022; Campanale et al., 2020; Aliko et al., 2022; Gugliandolo et al., 2020; Paluselli et al., 2018, Jebara et al., 2021). La maggior parte degli studi di campo e di laboratorio ha analizzato la tossicità dei micro e macro-detriti su varie specie di invertebrati e pesci e hanno rivelato che il tipo di polimero, le sue

dimensioni, la forma e la concentrazione sono variabili importanti nella determinazione della tossicità finale, a tutti i livelli di organizzazione biologica, cioè da quello sub-organico (ad esempio, effetti molecolari, cellulari e tissutali) e organismica fino ai livelli ecologicamente rilevanti (ad esempio, popolazione ed ecosistemi). Nel complesso, gli organismi acquatici si sono dimostrati molto sensibili all'ingestione di detriti di plastica, con effetti sia letali che sub-letali, quali alterazione del comportamento alimentare, alterazione della crescita e della fertilità, stress ossidativo, infiammazione, immunotossicità e stress ossidativo, neurotossicità e alterazioni delle vie metaboliche e dell'espressione genica (Hodkovicova et al., 2022; Bucci et al., 2020; Mincarelli et al., 2023; Banaee et al., 2023; Liu et al., 2020; Choi et al., 2021; Von Moos et al., 2012; Martyniuk et al., 2023; Vo & Pham, 2021).

Tuttavia, una panoramica della letteratura ha evidenziato che gli studi sui contaminanti chimici associati alla plastica (ad esempio, gli additivi della plastica) e il conseguente rilascio nell'ambiente acquatico sono ancora scarsi. Pochissimi studi di laboratorio hanno mostrato effetti letali e/o subletali negli organismi esposti alla plastica con contaminanti ambientali assorbiti (Browne et al., 2013; Lithner et al., 2012; Rochman et al., 2014). Inoltre, sono stati pubblicati pochi risultati recenti sulla tossicità degli additivi plastici nei pesci d'acqua dolce. I PAE (DBP, DEHP e BBP) sono stati segnalati per interrompere lo sviluppo scheletrico delle larve di pesce zebra (Pu et al., 2020; Qian et al., 2020). Nel pesce rosso, il bisfenolo A ha compromesso la maturazione gonadica nei maschi e nelle femmine riducendo l'espressione dei geni ipotalamo-ipofisi-gonadi (Wang et al., 2019) e ha alterato la funzione cardiaca inducendo rimodellamento strutturale e stress ossidativo (Filice et al., 2021). Chen et al., (2020) hanno riportato che un'altra classe di additivi plastici, i ritardanti di fiamma organofosfati, influenzano la velocità e la morfologia degli spermatozoi nei maschi adulti di *Gobiocypris rarus*, probabilmente alterando l'attività della Na⁺/K⁺ ATPasi piuttosto che il sistema ormonale. Studi ancora più limitati hanno valutato il grado di accumulo e la tossicità dei PAE su organismi invertebrati, come l'organismo sentinella *Mytilus spp.* (Impellitteri et al., 2023 a,b; Multisanti et al., 2022; Albergamo et al., 2016).

A questo proposito, Xu et al., (2021) hanno sottolineato che il DEHP influisce negativamente sulla regolazione osmotica e sul metabolismo energetico. Mincarelli et al., (2021) hanno dimostrato che la combinazione con fattori di stress, come il DEHP e lo

stress termico, può influenzare i tempi e il successo della stagione riproduttiva in *M. galloprovincialis*. In un altro lavoro successivo, Mincarelli e collaboratori, (2023) hanno sottolineato l'importanza di valutare il sesso e lo stadio di gametogenesi dei mitili quando si studia l'espressione genica (alterata) legata alla risposta allo stress di *M. edulis* esposta a DEHP. Recentemente, Andreyeva et al., (2023) hanno dimostrato che il DEHP si accumula principalmente nell'epatopancreas e induce effetti immunosoppressivi negli emociti dei mitili, tra cui il cambiamento della composizione dell'emolinfa e l'inibizione della produzione dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). La risposta generale non specifica al DEHP ha coinvolto anche la modulazione del complesso antiossidante nella ghiandola digestiva. Tuttavia, la ricerca bibliografica ha portato a constatare che i dati relativi al bioaccumulo e alla tossicità di NPP in *M. galloprovincialis* sono praticamente assenti.

Lo scopo di questo studio è stato quindi quello di fornire un quadro dettagliato sul bioaccumulo e sui potenziali effetti tossici del più comune NPP, il DEHT, su *M. galloprovincialis*, eseguendo un esperimento controllato di laboratorio e sfruttando un approccio multidisciplinare. In particolare, i mitili adulti sono stati esposti a dosi rilevati nell'ambiente e il bioaccumulo di DEHT è stato valutato in primo luogo mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). In seguito, è stata valutata l'alterazione del metabolismo lipidico e proteico mediante lo screening delle proteine totali e dei lipidi negli organismi interi e la composizione degli acidi grassi (FA) mediante gascromatografia accoppiata a rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID). La risposta generale allo stress dell'esposizione al DEHT è stata esplorata determinando la vitalità cellulare dell'emolinfa e della ghiandola digestiva dei mitili mediante appositi saggi di colorazione. Inoltre, sono stati analizzati i biomarcatori antiossidanti e di perossidazione lipidica e il danno ossidativo delle proteine sia nelle branchie che nella ghiandola digestiva. Si spera che i risultati di questo lavoro contribuiscano a delucidare per la prima volta l'entità del bioaccumulo e la tossicità degli additivi NPP sull'invertebrato *M. galloprovincialis*, a prevedere i loro esiti negativi a livello di organismo e di popolazione, e di aprire la strada allo studio della tossicità del DEHP rilasciati dai prodotti plastici nell'ambiente acquatico.

L'attività di ricerca ha contribuito alla pubblicazione di un articolo su rivista indicizzata del quale si riportano le informazioni fondamentali, figure e tabelle (Figura 4).



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

Figura 4: Porretti et al., 2023.

3.1.1.1. Cosa sono i plastificanti

Un plastificante è un additivo che è addizionato a un altro materiale (solitamente plastiche o un elastomero, ma anche gessi, intonaci, calcestruzzi) per aggiungere determinate proprietà con effetti differenti. I plastificanti impiegati per il cemento vengono usati per ammorbidirlo durante la fase iniziale in modo da migliorarne la lavorabilità senza alterarne le proprietà dopo l'asciugatura, per gli intonaci, essi migliorano la stendibilità della miscela, consentendo di usare meno acqua e accelerare l'asciugatura. I plastificanti per le materie plastiche servono a incrementare la flessibilità e la lavorabilità. Sono tra gli additivi più usati e sono inoltre anche quelli meno dispendiosi durante la fase di produzione di polimeri. I plastificanti sono solitamente incorporati in una composizione energetica come processo atto a migliorare la lavorabilità, flessibilità, e/o la distensibilità del legante della composizione. Questi miglioramenti sono accompagnati, per esempio, da alterazione delle proprietà meccaniche come la temperatura di transizione del vetro o la viscosità della formulazione (Marcilla, & Beltran, 2004).

Vi sono diverse forme isomeriche degli ftalati, tra cui isoftalati e tereftalati come mostrato in figura 5:

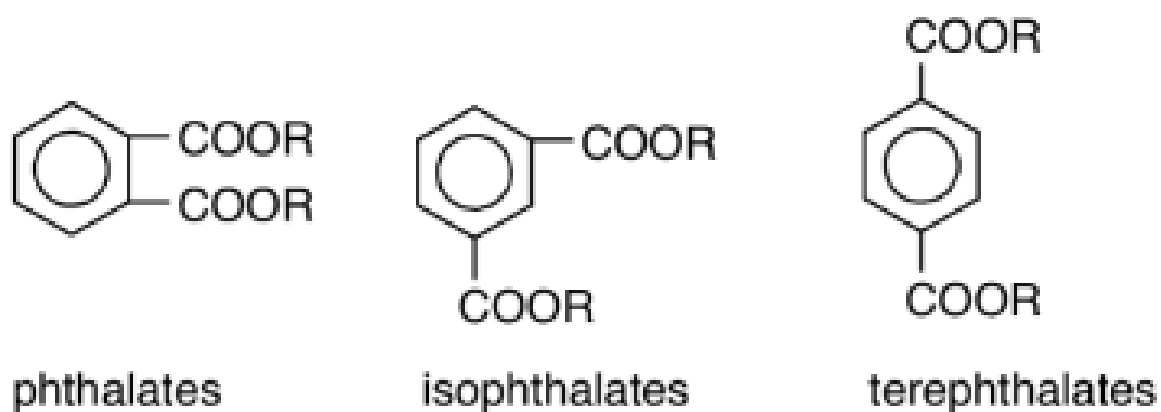


Figura 5: struttura chimica di ftalati, isoftalati e tereftalati.

Tra i tre gruppi, gli ftalati, che sono gli esteri dell'acido ftalico, sono tra i più popolari, in quanto, costituiscono circa l'80% di tutti i plastificanti usati. Gli esteri degli altri due acidi sono raramente usati in quanto hanno un costo maggiore. In generale la temperatura di ebollizione aumenta con la diminuzione del numero di atomi di C in alcol (o il peso molecolare) (Rosen, 1993.). La costante dielettrica, l'indice di rifrazione, il parametro di solubilità di Hildebrand e la tensione superficiale, diminuiscono tutte quando il numero di C aumenta. La viscosità del plastificante, la temperatura di combustione, e il coefficiente di ripartizione diminuiscono tutti all'aumentare degli atomi di C in alcol del plastificante (Matthews, 1996). Un plastificante ideale dovrebbe avere alta compatibilità con il polimero con cui si lega, stabili sia ad alte o basse temperature, insensibili dalle radiazioni solari ultraviolette (UV), resistenti alla lisciviazione e alla migrazione, poco costosi e in conformità alle normative di legge in merito alla salute e alla loro sicurezza (Rahman & Brazel, 2004). I plastificanti possono non essere attaccati alla catena polimerica da legami primari e quindi avere più possibilità di evaporare, e migrare, e sono definiti plastificanti esterni, quelli interni al contrario risultano essere intrinsecamente parte della struttura del polimero e hanno meno possibilità di migrazione (Frados, 1976). Inoltre, possono essere divisi come plastificanti primari o secondari. I primari sono usati come unico o componente principale nella formulazione delle plastiche, mentre i secondari sono miscelati con altri plastificanti primari o secondari, per migliorare alcune proprietà e/o ridurre i costi di produzione (Krauskopf, 1993).

I plastificanti sono inoltre usati anche nella formulazione di medicinali in campo farmaceutico. Ma in questo ambito, si richiede specifici criteri per il loro inserimento nelle formulazioni farmaceutiche: biocompatibilità, effetto del plastificante sul rilascio del farmaco, e sulle sue proprietà meccaniche, caratteristiche di lavorazione e analisi dei costi-benefici (Somwanshi et al., 2016). Il rischio maggiore dell'uso di alcuni plastificanti sta nella lisciviazione durante lo stoccaggio o nell'applicazione finale del farmaco. La lisciviazione del plastificante dipende strettamente dal tipo e dalla concentrazione del mezzo di dissoluzione, che insieme ad altri effetti (come tossicità o scarsa compatibilità) limita l'applicazione di alcuni plastificanti nella preparazione di imballaggi medici, farmaci e in campo alimentare (Li et al., 2008).

3.1.1.2. Plastiche e plastificanti in prodotti per la cura personale

Nell'industria cosmetica e dei prodotti per la cura della persona, una vasta gamma di prodotti contiene, intenzionalmente o meno, microplastiche tra gli ingredienti. Un esempio tipico sono gli esfolianti, che, con un singolo utilizzo, possono rilasciare tra le 4500 e le 94000 microsfele di plastica (Napper et al., 2015). Dai risultati di indagini da parte di Cosmetics Europe e di Euromonitor International si nota come nei Paesi dell'Unione Europea si usino oltre 4000 tonnellate di microsfele (~ 0,2 mm) ogni anno (Hernandez et al., 2017; Gouin et al., 2015), che possono così essere rilasciate nelle acque reflue domestiche fino ad arrivare all'ambiente acquatico (Duis & Coors, 2016). Nel corso degli anni sono state effettuate campagne per vietare l'uso di microsfele nei prodotti per la cura, portando così al bando e alla regolamentazione in alcuni Paesi (Carrington, 2016; Whyte & Sherden, 2016; UNEP, 2015). Molto spesso chi usa prodotti per la cura personale, giovani e adulti, risulta essere ignaro che tra gli ingredienti vi siano particelle di plastiche, e dei loro potenziali effetti. Nel lavoro di Anderson et al., (2016), è stata valutata la percezione dei partecipanti riguardo all'uso di microplastiche nei prodotti cosmetici e di cura della persona. La ricerca ha rivelato che oltre il 70% dei partecipanti non era a conoscenza della presenza di microplastiche né del loro impatto ambientale. Tuttavia, i partecipanti più giovani erano maggiormente consapevoli e preoccupati, soprattutto riguardo al consumo di frutti di mare potenzialmente contaminati da plastiche e alle potenziali conseguenze per la loro salute. Vi sono in

generale limitate informazioni sui livelli di ftalati nei cosmetici e prodotti per la cura personale e dei loro potenziali effetti sull'uomo (NRC, 2008). Plastificanti alternativi come diisononil-1,2-cicloesanedicarbossilato (DINCH), di(2-etilesil) tereftalato (DEHT) (Figura 6), e di(2-etilesil) adipato (DEHA) stanno progressivamente sostituendo gli ftalati classici nella produzione di prodotti per il consumo e professionale, a cause degli effetti avversi degli ftalati sulla riproduzione (Lessmann et al., 2017; Nehring et al., 2020). In quanto DINCH, DEHA e DEHT presentano analogie sia nella struttura chimica che nel metabolismo con ftalati come il di(2-etilesil) ftalato (DEHP). In base alle informazioni riportate nei fascicoli di registrazione REACH, queste sostanze sono utilizzate principalmente come plastificanti e ammorbidenti, ma hanno anche altre funzioni, ad es. come monomero, agente lubrificante, agente disperdente, agente legante, regolatore di viscosità, agente di flottazione, soppressore di polvere. Sono utilizzati in molte applicazioni come polimeri, articoli in plastica, vernici, inchiostri, adesivi, lubrificanti, fluidi per la lavorazione dei metalli, fluidi idraulici, uso in laboratorio. Alcune sostanze sono utilizzate nei cosmetici, dispositivi medici o nei materiali a contatto con gli alimenti (FCM) (ECHA, 2021; Rodriguez-Carmona et al., 2020). L'esposizione umana a questi sostituti degli ftalati può avvenire tramite ingestione, assorbimento cutaneo e inalazione. L'assorbimento cutaneo può portare a una maggiore concentrazione negli organi bersaglio rispetto all'ingestione, poiché la via di esposizione cutanea bypassa l'effetto di primo passaggio. Sebbene non esistano molti dati sulla tossicità dei DEHT nell'uomo, il loro uso è in costante aumento e quindi la crescente necessità di comprendere i modelli di esposizione sta guadagnando interesse scientifico e pubblico (Lessmann et al., 2019; Silva et al., 2019). I principali (potenziali) rischi per la salute umana di queste sostanze sono la tossicità riproduttiva e le proprietà di distruttori endocrini dovute alla somiglianza strutturale con gli ortoftalati.

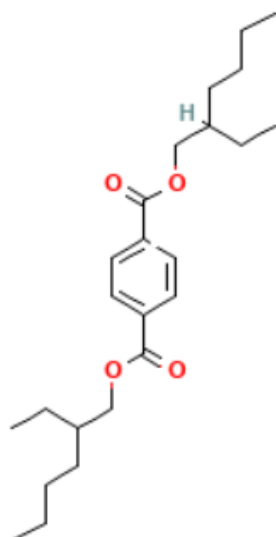


Figura 6: struttura chimica di bis(2-etilesile) tereftalato (DEHT) che presenta due sostituenti alchilici etilici (C8, rosso) con una spina dorsale C6 (blu) a causa della ramificazione dei sostituenti etilici.

3.1.1.3. Normative e regolamenti

Gli esteri dell'acido ftalico, come il dibutil ftalato (DBP), di-isobutil ftalato (DIBP), di-(2-etilesil) ftalato (DEHP) e l'n-butil benzil ftalato (BBP), sono stati identificati come sostanze di grande preoccupazione, anche se l'EFSA dopo studi condotti sul DIDP ha decretato che il DIDP non presenta attività antiandrogena (EFSA, 2019). Questi composti, noti per le loro proprietà di distruttori endocrini, hanno effetti tossici sulla riproduzione e rientrano nella categoria 1B delle sostanze chimiche secondo il Regolamento (CE) n. 1907/2006. Questa classificazione comporta una rigorosa regolamentazione per la loro produzione e il loro utilizzo all'interno dell'Unione Europea (European Union, 2013; European Commission, 2007; European Commission, 2006). Secondo il regolamento i 4 ftalati in questione sono contenuti in un'ampia varietà di articoli, poiché sono i più comunemente presenti nei materiali plastificati. L'esposizione può avvenire di conseguenza per ingestione di alimenti e polveri, per contatto orale con gli articoli, per inalazione di aria o polveri in ambienti chiusi e tramite il contatto delle polveri e degli articoli con le mucose e la pelle. Inoltre, si propone di limitare l'immissione sul mercato di articoli contenenti i quattro ftalati in una concentrazione di ciascun ftalato o di qualsiasi combinazione di tali ftalati pari o superiore allo 0,1 % in peso, dei materiali

plastificati. Tale limite di concentrazione avrebbe l'effetto di scoraggiare efficacemente l'uso dei quattro ftalati negli articoli che rientrano nell'ambito di applicazione della restrizione. Per quanto concerne il DEHT, sostituto in molte applicazioni del DEHP, l'ECHA (European Chemical Agency) ha valutato se vi sia un rischio nella sua applicazione, soprattutto in prodotti medici o i giocattoli (ECHA, 2016). Nel quadro della Strategia nazionale francese sugli interferenti endocrini del 2014, l'Autorità competente francese ha chiesto all'ANSES di valutare il profilo tossicologico del DEHT e di verificare se per questa sostanza siano necessarie misure di gestione del rischio. Gli studi finora disponibili non hanno indicato che esso sia nocivo per la salute umana o per l'ambiente, considerandolo non tossico per la riproduzione e non vi sono segnalazioni sulle potenziali proprietà di interferente endocrino. Tuttavia, il documento evidenzia alcune incertezze. Come alcuni studi sperimentali rafforzerebbero la valutazione del potenziale rischio ambientale di questo composto, quali la sua capacità di persistenza nei sedimenti e nel suolo, potenziale di bioaccumulo nei vertebrati acquatici, e tossicità per gli organismi terrestri, inoltre un suo metabolita, l'acido 2-etilesanoico (2-EHA), è classificato come *Repro. 2 H361d*, e ne è in corso la sua valutazione ambientale in Spagna, nell'ambito della valutazione delle sostanze REACH. Per il DEHT non sono necessarie ulteriori azioni fino a quando la Spagna non si pronuncerà sul rischio ambientale di questo metabolita. Per la salute umana, non ci sono prove della formazione di 2-EHA durante il metabolismo del DEHT, e per tanto questo metabolita non dovrebbe comportare alcun rischio. In conclusione, sulla base di queste informazioni e tenendo conto del fatto che il DEHT viene sviluppato come sostituto degli ftalati, la Francia ritiene che, sulla base dei dati attualmente disponibili, il DEHT non richieda un'ulteriore gestione del rischio. Tuttavia, la valutazione del DEHT potrebbe essere riconsiderata a seconda dell'esito della valutazione del metabolita (2-etilesano).

Più recentemente, nel novembre 2021, la Commissione Europea ha inserito anche il DEHP, DBP, BBP e DIBP come aventi proprietà di interferenti endocrino oltre che tossici per la riproduzione. L'aggiornamento dei pericoli di questi composti comporterà la richiesta di autorizzazione REACH per usi che prima ne erano esenti, ad esempio: l'uso del DEHP nei materiali a contatto con gli alimenti, nei dispositivi medici e nei loro imballaggi; e il BBP e DBP nel confezionamento di medicinali.

3.1.2. Materiali e Metodi

3.1.2.1. Disegno sperimentale

Lo studio è stato condotto nei mesi di novembre e dicembre 2022 e gli esemplari di *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) sono stati selezionati per studiare la tossicità del plastificante DEHT. In totale un numero pari a $n = 150$ cozze adulte con una lunghezza media di 4.6 ± 0.38 cm e peso medio di 8.2 ± 2.1 g, sono stati raccolti presso l'allevamento di molluschi FARAU SRL Frutti di Mare situato al “Lago di Faro”, una laguna costiera di Messina (Italia, $38^{\circ}15'39,95''N$ $15^{\circ}37'01,9''E$) rinomata per la molluscoltura, in conformità con le linee guida della Direttiva (2010)/63/UE sulla sperimentazione animale. Le cozze raccolte sono state trasportate in laboratorio in acqua di mare naturale aerata e acclimatate per una settimana in acqua salata artificiale (Premium REEF-Salt, Tropical Marine Centre, Chorleywood, Regno Unito) a temperatura costante ($18,2 \pm 0,12$ °C) e aerazione. Dopo il periodo di acclimatazione, sono stati suddivisi in modo casuale in sei vasche di vetro (20L) con aerazione continua e sono stati creati due gruppi sperimentali e un gruppo di controllo in duplice copia ($n = 25$ esemplari per vasca). I gruppi sperimentali sono stati esposti separatamente a due diverse concentrazioni di DEHT (CAS n. 6422-86-2, purezza $\geq 96\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania), ovvero DEHT1 (1 mg/l, concentrazione ambientale, EC) e DEHT100 (100 mg/l, 100xEC). I gruppi di controllo, invece, non hanno ricevuto alcun trattamento di esposizione. Il periodo di esposizione è durato 14 giorni. Durante il periodo di studio, le cozze sono state tenute costantemente in condizioni di luce naturale e non sono state alimentate; l'acqua salata è stata rinnovata tre volte a settimana (ai giorni 2, 4, 6, 8, 10 e 12), con l'aggiunta delle stesse concentrazioni di DEHT subito dopo. Non è stata osservata alcuna mortalità durante l'intero periodo di esposizione. La concentrazione di DEHT di 1 mg/l è stata scelta sulla base dei livelli di DEHT recentemente rilevati nelle acque marine dell'area mediterranea (0,78 mg/l, Jebara et al., 2021; 0,68-1.21 mg/l, Gugliandolo et al., 2020), mentre la concentrazione di 100 mg/l, che corrisponde a 100 volte la concentrazione ambientale, è stata considerata anche in relazione a lavori precedenti (Stara et al., 2021). È stata scelta un'esposizione di 14 giorni considerando che il DEHT non è un plastificante altamente persistente e accumulabile (Bui et al., 2016) e sulla base di uno studio precedente (Martyniuk et al., 2023).

3.1.2.2. Raccolta dei campioni

Per l'analisi chimica sono stati selezionati a caso $n = 16$ organismi da ciascun gruppo e il loro corpo intero è stato sezionato, riunito, liofilizzato, macinato in polvere fine e conservato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino all'esecuzione dello studio di bioaccumulo e la valutazione di lipidi totali, proteine e composizione degli acidi grassi. Inoltre, sono stati prelevati $n = 8$ campioni di acqua (50 mL) da ciascun gruppo sperimentale/di controllo, raccolti in bottiglie di vetro prima e dopo ogni cambio d'acqua e conservati a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento delle analisi. Per l'analisi biologica, sono stati selezionati a caso $n = 4$ organismi da ciascun gruppo sperimentale e selezionati in modo casuale da ciascun gruppo sperimentale e raggruppati per valutare la vitalità cellulare e la capacità di regolare la diminuzione del volume. In questo caso, l'emolinfa (un tessuto fluido che svolge le funzioni analoghe a quelle del sangue e della linfa dei vertebrati) è stata raccolta dal muscolo adduttore anteriore delle cozze di ciascun gruppo sperimentale/di controllo, utilizzando una siringa di vetro con ago da 23, secondo le indicazioni di Bolognesi & Fenech, (2012). Dopo la raccolta dell'emolinfa, ogni gruppo proveniente da ciascuna vasca di mitili è stato sacrificato su ghiaccio e le ghiandole digestive (GD) sono state sezionate e raccolte. Per i biomarcatori antiossidanti e il danno proteico ossidativo, $n = 6$ cozze sono state selezionate a caso e le loro branchie e le GD sono state raccolte e conservate a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'uso. Durante lo studio di esposizione e le successive procedure sperimentali, è stato fatto ogni sforzo per ridurre significativamente la potenziale contaminazione di fondo da DEHT di solventi, reagenti e materiali di laboratorio. Tutti i campioni sono stati trattati utilizzando vetreria e strumenti in acciaio inossidabile, precedentemente lavati con acetone, risciacquati con esano e asciugati a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ per almeno 4 ore. Il solfato di sodio è stato riscaldato per 4 ore a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, dopo il raffreddamento, conservato in una fiala di vetro a tenuta stagna. I solventi organici sono stati analizzati per i livelli di fondo e l'analisi GC-MS. Solo i lotti di solventi contrassegnati da livelli di contaminazione trascurabili sono stati utilizzati per tutta la procedura analitica.

3.1.2.3. Determinazione del DEHT nei campioni di cozze e di acqua

La determinazione del contenuto di DEHT nei mitili dei gruppi sperimentali e di controllo, nonché nell'acqua di stabulazione, è stata effettuata secondo il metodo proposto da Jebara et al., (2021). In breve, 0,1 g di ogni campione in polvere sono stati addizionati con una quantità nota di standard deuterato (DEHT-d4 in nonano, 100 µg/mL, Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA) e mescolati con 0,2 g di solfato di sodio anidro (Sigma-Aldrich) e 0,4 g di silicato di magnesio solido sorbente (Florisol®, 60-100 mesh, polvere grossa, Fluka, Sigma-Aldrich). La miscela così ottenuta è stata aggiunta alla sommità di una pipetta Pasteur in vetro che era stata precedentemente impaccata con 0,1 g di Florisol e lana di vetro, e sigillata in cima con altra lana di vetro. L'estratto è stato eluito con una soluzione di *n*-esano: acetone (1:1 v/v; grado >99,9%, Sigma-Aldrich) ed evaporato a secco con un rotavapor (Buchi V700, BUCHI Labortechnik AG, Svizzera). (Buchi V700, BUCHI labortechnik AG, Svizzera). Il DEHT presente nelle acque proveniente da ogni vasca è stato determinato utilizzando una cartuccia C18 (Supelclean C18, 3 mL, 500 mg di 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 di metanolo una soluzione di metanolo: acqua (35%, v/v). Il DEHT è stato eluito con 5 mL acetato di etile ed evaporato a secco con un rotavapor.

Tutti gli estratti essiccati sono stati risospesi in *n*-esano e analizzati con un sistema di gascromatografia (GC-2010, Shimadzu, Giappone) dotato di un autocampionatore (HT300A, HTA, Italia) e accoppiato a uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo (QP-2010 Plus, Shimadzu, Giappone). Le separazioni cromatografiche sono avvenute su una colonna capillare SLB-5MS (30 m × 0,25 mm i. d. × 0,25 µm di spessore del film, Supelco, USA). Il programma di temperatura del forno era: da 60 °C a 190 °C a 8 °C/min (5 min di mantenimento), e da 240 °C a 315 °C a 8 °C/min. La porta di iniezione si trovava a 260 °C ed era provvista di un liner di ingresso stretto (0,75 mm ID, Agilent Technologies). L'iniezione del campione è avvenuta in modalità splitless, con un tempo di campionamento di 60 s e un rapporto di splittaggio 1:15. Il volume di iniezione era di 1 µL. Il gas vettore (He, 210,0 Kpa, modalità di controllo della pressione) è stato utilizzato ad

una velocità lineare di 30 cm/s. Il setup MS è stato impostato come segue: Temperatura della sorgente EI; 200 °C; energia di ionizzazione e corrente di emissione, 70 eV e 250 µA; temperatura dell'interfaccia e tensione del moltiplicatore di elettroni, 300 °C. di interfaccia e tensione del moltiplicatore di elettroni, 300 °C e 1.0 kV. L'acquisizione è stata eseguita sia in full scan (intervallo di massa 40-400 m/z) che in monitoraggio di ioni selezionati (SIM) monitorando tre frammenti di massa caratteristici dell'analita (Tabella 1). L'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono state eseguite con il software GCMS solution. L'identificazione del DEHT è avvenuta per confronto del suo tempo di ritenzione e dello spettro di massa con quello del corrispondente standard commerciale (DEHT, purezza >99%, Aldrich Chemical, Chicago, IL, USA). La procedura quantitativa è stata eseguita in modalità SIM, considerando lo ione di picco relativo della base (Tabella 1) e sfruttando la normalizzazione dello standard interno. Per ogni campione sono state effettuate misurazioni in triplo, alternate a bianchi analitici (solvente) e, nel caso dei pool di mitili, i risultati sono stati espressi in base al peso fresco convertito (fw). Durante l'intero periodo di studio, sono state rilevate tracce di DEHT (1,07 µg/kg) in questi bianchi, che sono stati costantemente sottratti dall'analisi degli estratti dei campioni.

Tabella 1: Tempo di ritenzione (t_R), peso molecolare (g/mol) e ioni monitorati dell'analita target (m/z). Gli ioni sottolineati sono stati presi in considerazione per l'analisi quantitativa.

Analita	t_R (min)	Peso molecolare (g/mol)	Ioni monitorati (m/z)
DEHT	37,5	390,57	<u>149</u> , 112, 261

3.1.2.4. Lipidi totali e composizione degli acidi grassi

Per l'estrazione dei lipidi dai mitili provenienti da ciascuna vasca sperimentale è stato eseguito secondo il metodo raccomandato dalle linee guida dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE, 2012). Brevemente, ogni campione in polvere (~4 g) è stato omogenizzato con 40 mL di una miscela cloroformio: metanolo (1:2, v/v, grado HPLC, Carlo Erba), e poi in un bagno a ultrasuoni per 30 minuti. La miscela è stata addizionata con 10 mL di NaCl 0,73%, agitata e centrifugata a 6300×g per 10 min

(Awel Industries, Francia, MF 20-R). La fase inferiore del cloroformio è stata quindi trasferita in una beuta, mentre la fase superiore è stata nuovamente estratta secondo la stessa procedura. Quindi, le due fasi di estrazione sono state riunite, filtrate con solfato di ammonio anidro ed essiccate. Dopo aver determinato gravimetricamente la resa di estrazione (%) sulla base del peso fresco (fresh weight, fw), l'estratto lipidico è stato recuperato con 1 mL di *n*-esano, addizionato con 1 mL di metossilato di sodio e riscaldato a 100 °C per 15 min. Dopo aver raffreddato la miscela, è stato aggiunto 1 mL di trifluoruro di boro/metanolo (14%) e nuovamente riscaldato nelle stesse condizioni. Alla miscela raffreddata sono stati aggiunti circa 1 mL di *n*-esano e 4 mL di una soluzione satura di cloruro di sodio. Lo strato organico con gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) è stato raccolto e analizzato mediante un gascromatografo (GC) dotato di un iniettore split/splitless e di un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (Dani Master GC1000, Dani Instrument, Milano, Italia). Una colonna capillare Supelco SLB-IL100, 60 m × 0,25 mm ID, spessore del film 0,20 µm (Supelco, Sigma Aldrich, USA). Sono state utilizzate le seguenti condizioni operative: programma di temperatura del forno 60 °C per 2 minuti alla velocità di 13 °C/min, 150 °C alla velocità di 2 °C/min e 240 °C per 10 minuti; le temperature dell'iniettore e del rivelatore erano rispettivamente 220 °C e 250 °C; elio a una velocità lineare di 30 cm/s (costante). Il volume di iniezione è stato di 1 µL, con uno split di 75.0 mL/min. L'acquisizione e la gestione dei dati sono state eseguite con il software Clarity Chromatography Software v4.0.2. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato insieme ai bianchi analitici. I FAME di interesse nutrizionale sono stati identificati per confronto diretto con i tempi di ritenzione di riferimento dei composti presenti nella miscela standard commerciale (FAMEs standard di riferimento C4-C24, Supelco (Bellefonte, PA, USA). Per ogni campione, sono state calcolate le percentuali dei singoli FAME rispetto all'area totale del cromatogramma in analisi in tripla analisi.

3.1.2.5. *Proteine totali*

La proteina grezza è stata determinata da ogni campione in polvere (~1 g) costituito da cozze in pool, utilizzando il metodo Kjeldahl già proposto nel nostro precedente lavoro sugli organismi marini (Costa et al., 2019). Per ogni campione, il contenuto di azoto ottenuto attraverso il saggio è stato utilizzato per calcolare la proteina grezza su base di peso secco (dry weight, dw) secondo la formula:

$$\textbf{Proteina (\%, dw) = \% Azoto \times 6.251}$$

Il contenuto proteico è stato successivamente espresso in %, fw. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato insieme ai bianchi analitici e i risultati sono stati espressi in termini di fw convertito.

3.1.2.6. *Saggi di vitalità cellulare*

Per valutare gli effetti del DEHT sulla vitalità cellulare sono state prese in considerazione l'emolinfa e le GD di mitili in pool. I test sono stati condotti utilizzando due diversi saggi colorimetrici, ovvero il metodo di esclusione del Trypan Blue (TB, Sigma-Aldrich) e il saggio di ritenzione del Rosso Neutro (RN, Sigma-Aldrich), tramite conta cellulare su camera di Burker (Figura 7).

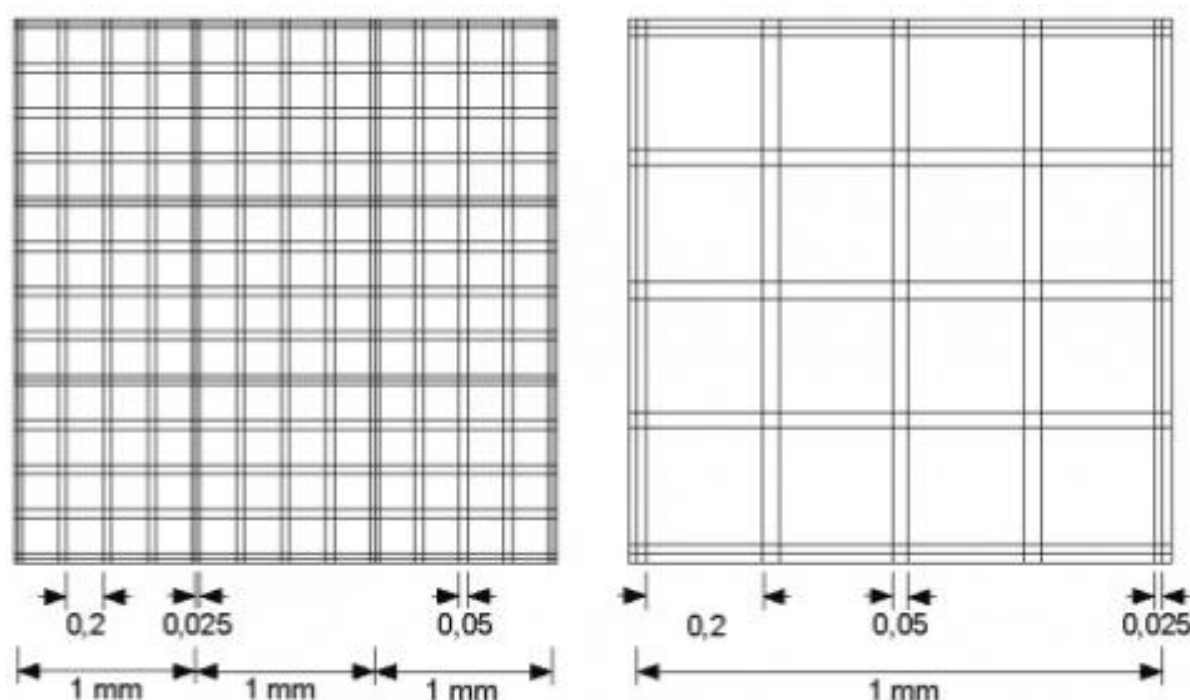


Figura 7: Camera di Burkert, costituita da un vetrino rettangolare, con lati rispettivamente di 7.5 cm e 3.5 cm e uno spessore di 4 mm. Presenta 2 celle di 3 x 3 mm, profonde 0,1 mm, ciascuna divisa in 9 quadrati di 1 mm, ognuno con 16 quadrati di 0,2 x 0,2 mm, e superficie di 1/25 mm²; vi sono inoltre 9 quadrati più piccoli, (0,05 mm e 1/400 mm²), e 24 rettangoli con una superficie di 1/100 mm² interposti ai nove quadrati da 1 mm.

Il primo metodo citato prevede la colorazione delle cellule con il TB, un colorante che ha la capacità di entrare solo nelle cellule non vitali con membrane cellulari compromesse. Questo perché, in circostanze normali, le cellule vitali impedirebbero l'assorbimento del colorante TB. La percentuale di cellule non colorate rappresenta la percentuale di cellule vitali nella sospensione cellulare. Questa valutazione aiuta a determinare l'entità del danno causato alle cellule. Inoltre, la stabilità della membrana lisosomiale è stata valutata utilizzando il saggio di ritenzione del RN. Secondo Torre et al., (2013), questo test si basa sulla capacità delle cellule vive di assorbire e legare il RN nei loro lisosomi, dopo aver incubato le cellule per 15 minuti. L'entità della ritenzione del colorante fornisce indicazioni sulla stabilità dei lisosomi. Per calcolare la percentuale di vitalità cellulare, è stata utilizzata la seguente formula:

$$\text{Vitalità cellulare (\%)} = \frac{\text{Numero di cellule vitali}}{\text{Numero totale di cellule}} \times 100$$

3.1.2.7. Diminuzione della regolazione del volume cellulare

Le cellule sono strutture semi porose contenenti sostanze chimiche disperse in un fluido, il che le rende particolarmente vulnerabili ai cambiamenti osmotici. In quanto, qualsiasi squilibrio nel numero di particelle disciolte tra l'interno e l'esterno di una cellula può causare l'afflusso di acqua, l'esplosione della membrana cellulare o la fuoriuscita di liquido, con il conseguente restringimento della cellula. In alcuni casi, le alterazioni del volume cellulare minacciano il corretto funzionamento di un organo/tessuto. Per evitare alterazioni di volume, tutte le cellule sane hanno meccanismi adattati per equalizzare l'attività osmotica tra il loro ambiente interno ed esterno.

Le cellule della GD sono state isolate secondo il metodo di Pagano e collaboratori (2017). La GD è stata tagliata in una soluzione priva di calcio e magnesio (CMSF), quindi trasferito in una provetta di vetro contenente collagenasi allo 0,01% (CLS IV, 175 U/mg, Sigma-Aldrich) e posto in un bagno termostato per 60 minuti a 18 °C. La sospensione cellulare è stata filtrata attraverso filtri da 200 µm e 50 µm, risospesa con una soluzione fisiologica e quindi centrifugata per 10 minuti a 4 °C, a 400×g (Awel Industries, Francia, MF 20-R). Il surnatante è stato rimosso e le cellule sono state risospese due volte con una soluzione fisiologica. I campioni sono stati trasferiti nuovamente nel bagno termostato (18 °C) per un'altra ora.

La goccia di campione di cellule è stata posta su un vetrino lisinato, per permettere l'adesione delle cellule e osservate al microscopio ottico (Carl Zeiss Axioskop 20, Wetzlar, Germania) collegato a una fotocamera digitale (Canon 550D). Il campione è stato lavato delicatamente con una soluzione isotonica, per eliminare residui di non interesse, e sono state scattate tre immagini in sequenza. Successivamente, il campione è stato lavato delicatamente con una soluzione ipotonica (800 mOsm), per i successivi primi 10 minuti le immagini sono state scattate ogni 1 minuto e poi ogni 5 minuti negli ultimi 20 minuti. L'area delle cellule dei mitili esposti è stata confrontata con quella del gruppo di controllo con il software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Sono state scattate immagini per un totale di 15 cellule per ogni gruppo sperimentale.

3.1.2.8. Determinazione di biomarcatori antiossidanti e di perossidazione lipidica e di proteine ossidativamente modificate

Le branchie e la ghiandola digestiva (n = 6 per ogni condizione sperimentale e di controllo) sono state omogeneizzate in tampone Tris/HCl 100 mM (pH 7,2), contenente una miscela di inibitori delle proteasi per valutare l'attività della superossido dismutasi (SOD), la perossidazione lipidica (LPO) e le proteine ossidativamente modificate (OMP). L'attività della SOD è stata determinata con il metodo descritto da Marklund & Marklund, 1974, modificato secondo Filice et al., 2023. L'effetto inibitorio della SOD sull'autossidazione del pirogallolo a pH 8.2 è stato valutato spettrofotometricamente a 420 nm e 25 °C. La reazione è stata eseguita in 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM pirogallolo e monitorata ogni 30 secondi per 5 min. Un'unità di attività SOD è stata definita come la quantità di enzima che inibisce il 50% dell'auto-ossidazione del pirogallolo. I risultati sono stati espressi in U/mg di proteine. La LPO è stata determinata misurando la concentrazione di sostanze che reagiscono all'acido 2-tiobarbiturico (TBARS), come riportato in (Filice et al., 2021). La miscela di reazione contenente l'omogenato del campione (10% p/v), l'acido 2-tiobarbiturico (TBA, 0,8%) e l'acido tricloroacetico (TCA; 20%) è stata mantenuta in un bagno d'acqua a 100 °C per 10 minuti e poi centrifugata a 5000×g per 10 minuti (Sigma Laborzentrifugen, Germania, 1-15). I livelli di TBARS sono stati determinati nel surnatante valutando la concentrazione di malondialdeide (MDA) a 540 nm (coefficiente di estinzione MDA: $156.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); i valori di TBARS sono stati riportati come nmoli MDA/mg di proteine. L'OMP è stato valutato misurando il contenuto di gruppi carbonilici secondo il metodo della 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), descritto da Levine et al., (2000). Aliquote di omogenati sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con 10 mM di DNPH in 2 M HCl; le proteine sono state quindi precipitate con 2 volumi di TCA e centrifugate a 5000×g per 10 minuti. (Sigma Laborzentrifugen, Germania, 1-15). Il pellet è stato lavato tre volte con etanolo-etil acetato (1:1; v/v) per rimuovere l'eccesso di DNPH e quindi disciolto in guanidina 6 M in 2 N HCl. La concentrazione dei gruppi carbonilici è stata misurata spettrofotometricamente a 370 nm (derivati aldeidici) e a 430 nm (derivati chetonici) utilizzando il coefficiente di estinzione di $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. I risultati sono stati espressi come nmol/mg di proteina.

3.1.2.9. *Analisi statistica*

I dati sperimentali relativi alla determinazione del contenuto di DEHT, del contenuto totale di lipidi, della composizione di acidi grassi, del contenuto totale di proteine, della vitalità cellulare e della regolazione del volume cellulare sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD) di analisi in triplo. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software Graphpad Prism, versione 5 (Graphpad Software Ltd., USA, 2003). Dopo aver eseguito il test di Shapiro-Wilk per verificare la distribuzione normale dei dati sperimentali, è stata applicata l'ANOVA a una via per ogni variabile indipendente per produrre una statistica F, cioè il rapporto tra la varianza calcolata tra le medie e la varianza all'interno dei campioni. L'ANOVA a una via è stata seguita da un post-hoc Tukey Test per le analisi comparative multiple tra gruppi sperimentali e di controllo. La significatività statistica è stata sempre accettata a $p < 0,05$. I dati sullo stress ossidativo sono stati espressi come medie $\pm$ errore standard (SE) di singoli esperimenti eseguiti in duplicato; la significatività è stata considerata a valori di $p < 0,05$.

3.1.3. Risultati

3.1.3.1. Livelli di DEHT nei campioni di *M. galloprovincialis* e nell'acqua di stabulazione

I livelli di DEHT rilevati tramite GC-MS nei campioni di acqua e di mitili sono riportati nella Tabella 2. L'acqua proveniente dalla vasca di controllo è stata considerata priva di DEHT, in quanto il DEHT era al di sotto del limite di rilevabilità (<LOD, dove LOD = 0,04 µg/kg). In entrambi i campioni di acque provenienti dai trattamenti di esposizione, le concentrazioni di DEHT rilevate sono state >92% della concentrazione nominale per tutto il periodo di esposizione e quindi significativamente diverse l'una dall'altra (DEHT1: 0.95 mg/l e DEHT100: 96.36 mg/L, $p < 0,05$). Le cozze mantenute in acqua salata priva di DEHT (Controllo) non hanno mostrato alcun bioaccumulo di tale plastificante non-ftalico. I mitili provenienti dal trattamento DEHT1 hanno bioaccumulato in media 123.69 mg/kg di questo plastificante, mentre i mitili DEHT100 hanno bioaccumulato il DEHT a una concentrazione media di 595.13 mg/kg, significativamente diversi tra loro ($p < 0,05$).

Tabella 2: Concentrazione di DEHT rivelata da GC-MS nelle acque sperimentali (mg/L) e nelle vasche di controllo e trattate (cioè DEHT1 e DEHT100) di *M. galloprovincialis* (mg/Kg, fw). I dati sono presentati come media $\pm$ SD di analisi in triplo. LOD = limite strumentale di rilevamento del DEHT (0.04 µg/kg).

Campione	Gruppi testati		
	Controllo	DEHT1	DEHT100
Acqua	<LOD	0,95 $\pm$ 0,02 ^a	96,36 $\pm$ 11,54 ^b
Pool di mitili	<LOD	123,69 $\pm$ 23,52 ^a	595,13 $\pm$ 41,99 ^b

a-b: lettere di apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0.05$ post hoc Tukey test).

3.1.3.2. Lipidi totali e contenuto degli acidi grassi

I lipidi totali e il contenuto degli acidi grassi (FA) ottenuti dalle cozze di controllo sono riportati nella Tabella 3. I lipidi totali erano pari al 5,52% fw nel gruppo di controllo. D'altra parte, l'esposizione al DEHT ha causato un forte aumento dei lipidi, poiché i gruppi DEHT1 e DEHT100 hanno mostrato contenuti lipidici rispettivi dell'8,75% e dell'8,41% fw. L'analisi statistica ha mostrato una differenza significativa ($p < 0.05$) per entrambi i gruppi DEHT1 e DEHT100 rispetto alla condizione di controllo (Tabella 3). Indipendentemente dalla condizione di controllo o sperimentale, la composizione di FA di *M. galloprovincialis* è stata caratterizzata da un elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi (poli-unsaturated fatty acid (PUFA), 36,71-39,88%, $p < 0,05$), seguito da un livello intermedio di acidi saturi (saturated fatty acid (SFA), 27,28-32,19%, $p < 0,05$) e da una minore quantità di acidi grassi monoinsaturi (mono-unsaturated fatty acid (MUFA), 16,11-17,39%, $p > 0,05$). Gli acidi grassi più abbondanti rivelati nei tessuti molli delle cozze sono stati l'acido palmitico (C16:0, 19,33-22,90%, $p < 0,05$), l'acido stearico (C18:0, 4,67-6,01%, $p < 0,05$), l'acido palmitoleico (C16:1 ω -7, 4,47-6,41%, $p < 0,05$), acido eicosapentaenoico (C20:5 ω -3, 12,86-14,59%, $p < 0,05$) e acido docosaesaenoico (C22:6 ω -3, 14,92-15,91%, $p > 0,05$) (Tabella 3). L'esposizione al DEHT ha influenzato il metabolismo lipidico di *M. galloprovincialis* rispetto alla condizione di controllo. Al contrario, sono stati osservati cambiamenti non significativi tra i mitili DEHT1 e DEHT100, che erano sostanzialmente simili sia nel contenuto lipidico che nella composizione dei FA. Complessivamente, è stato registrato un aumento dei lipidi totali dal 5,52% nei mitili di controllo all'8,75-8,41% ($p < 0.05$) negli organismi esposti. Inoltre, è stata riscontrata una diminuzione generale degli SFA, che si riflette in particolare nella variazione dell'acido palmitico dal 22,90% (controllo) al 20,73-19,33% (esposizione al DEHT, $p < 0,05$), e soprattutto un aumento generale dei PUFA, evidenziato in particolare dalla variazione degli ω -3 FA dal 30,82% (controllo) al 33,96-33,38% (esposizione al DEHT, $p < 0,05$). Per quanto riguarda questi ultimi, la maggior parte dei PUFA è stata caratterizzata da una tendenza all'aumento dopo l'esposizione al DEHT (ad esempio, l'acido stearidonico (C18:4 ω -3) è aumentato dall'1,24% all'1,59-1,71%, $p < 0,05$), ad eccezione dell'acido arachidonico (C20:4 ω -6), che è leggermente diminuito dal 4,35% al 4,04-4,01% ($p > 0,05$). È interessante notare che il plastificante DEHT non ha indotto cambiamenti significativi nei MUFA (Tabella 3).

Tabella 3: Profilo dei lipidi totali (% fw) e degli acidi grassi (% dei lipidi totali, fw) dei pool di controllo e trattati (cioè DEHT1 e DEHT100) di *M. galloprovincialis*. I dati sono presentati come media $\pm$ SD di analisi in triplo.

Analita (%)	Gruppi testati		
	Controllo	DEHT1	DEHT100
Lipidi totali	5,52 $\pm$ 0,53 ^a	8,75 $\pm$ 0,36 ^b	8,41 $\pm$ 0,94 ^b
C14:0	2,07 $\pm$ 1,36 ^a	2,63 $\pm$ 0,22 ^a	2,35 $\pm$ 0,19 ^a
C16:0	22,90 $\pm$ 0,35 ^a	20,73 $\pm$ 0,76 ^b	19,33 $\pm$ 0,42 ^b
C17:0	1,21 $\pm$ 0,02 ^a	0,98 $\pm$ 0,04 ^{a,b}	0,93 $\pm$ 0,08 ^b
C18:0	6,01 $\pm$ 0,52 ^a	4,81 $\pm$ 0,29 ^{a,b}	4,67 $\pm$ 0,39 ^b
SFA	32,19 $\pm$ 0,84 ^a	29,15 $\pm$ 0,91 ^b	27,28 $\pm$ 0,97 ^b
C16:1 ω-7	4,47 $\pm$ 0,11 ^a	5,84 $\pm$ 0,25 ^b	6,41 $\pm$ 0,19 ^c
C17:1	1,12 $\pm$ 0,26 ^a	1,25 $\pm$ 0,08 ^a	1,05 $\pm$ 0,05 ^a
C18:1 ω-9	5,81 $\pm$ 0,24 ^a	3,36 $\pm$ 0,15 ^b	3,53 $\pm$ 0,25 ^b
C18:1 ω-7	2,23 $\pm$ 0,41 ^a	2,30 $\pm$ 0,07 ^a	2,20 $\pm$ 0,11 ^a
C20:1 ω-11	1,51 $\pm$ 0,51 ^a	1,69 $\pm$ 0,14 ^a	1,54 $\pm$ 0,10 ^a
C20:1 ω-7	0,97 $\pm$ 0,06 ^a	1,11 $\pm$ 0,08 ^a	1,03 $\pm$ 0,05 ^a
C20:1 ω-9	1,87 $\pm$ 0,18 ^a	1,84 ^a $\pm$ 0,17	1,60 $\pm$ 0,13 ^a
MUFA	16,11 $\pm$ 0,54 ^a	17,39 $\pm$ 0,14 ^b	17,36 $\pm$ 0,01 ^b
C18:2 ω-6	0,92 $\pm$ 0,07 ^a	1,01 $\pm$ 0,01 ^a	0,96 $\pm$ 0,05 ^a
C18:3 ω-6	0,06 $\pm$ 0,01 ^a	0,11 $\pm$ 0,01 ^a	0,10 $\pm$ 0,01 ^a
C18:3 ω-3	0,48 $\pm$ 0,04 ^a	0,41 $\pm$ 0,04 ^a	0,44 $\pm$ 0,04 ^a
C18:3 ω-4	0,18 $\pm$ 0,01 ^a	0,27 $\pm$ 0,02 ^b	0,29 $\pm$ 0,01 ^b
C18:4 ω-3	1,24 $\pm$ 0,12 ^a	1,59 $\pm$ 0,10 ^b	1,71 $\pm$ 0,17 ^b
C20:2 ω-6	0,26 $\pm$ 0,03 ^a	0,36 $\pm$ 0,04 ^a	0,38 $\pm$ 0,03 ^a
C20:3 ω-6	0,18 $\pm$ 0,01 ^a	0,14 $\pm$ 0,01 ^b	0,31 $\pm$ 0,03 ^c
C20:4 ω-6	4,35 $\pm$ 0,39 ^a	4,04 $\pm$ 0,41 ^a	4,01 $\pm$ 0,20 ^a
C20:5 ω-3	12,86 $\pm$ 0,47 ^a	14,59 $\pm$ 0,67 ^b	14,08 $\pm$ 0,15 ^b
C22:5 ω-3	1,26 $\pm$ 0,05 ^a	1,35 $\pm$ 0,08 ^a	1,40 $\pm$ 0,10 ^a
C22:6 ω-3	14,92 $\pm$ 0,99 ^a	15,91 $\pm$ 0,82 ^a	15,66 $\pm$ 0,20 ^a
PUFA	36,71 $\pm$ 0,20 ^a	39,88 $\pm$ 0,39 ^b	39,34 $\pm$ 0,74 ^b

Σω3	30,82 ± 0,32 ^a	33,96 ± 0,14 ^b	33,38 ± 0,47 ^b
Σω6	5,71 ± 0,29 ^a	5,59 ± 0,37 ^a	5,81 ± 0,24 ^a
ω6/ω3	0,18 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01 ^a

a-c: lettere di apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0.05$ con il post hoc Tukey test); le stesse lettere di apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0.05$ con il post hoc Tukey test).

3.1.3.3. Proteine totali

Le proteine totali delle cozze di controllo e di quelle esposte sono riportate nella Tabella 4. Il contenuto medio di proteine di *M. galloprovincialis* nel gruppo di controllo era pari al 15,95% ed è diminuito dopo l'esposizione al DEHT, mentre i mitili DEHT1 e DEHT100 avevano rispettivamente livelli medi di proteine del 14,76% e dell'11,46%. L'analisi statistica ha mostrato una diminuzione significativa ($p < 0,05$) per il gruppo DEHT100 rispetto al gruppo di controllo e per il gruppo DEHT1 rispetto al gruppo DEHT100.

Tabella 4: Proteine totali (% fw) dei gruppi di controllo e trattati (cioè DEHT1 e DEHT100) di *M. galloprovincialis*. I dati sono presentati come media ± SD di analisi in triplo.

	Gruppi testati		
	Controllo	DEHT1	DEHT100
Proteine totali (%)	15,95 ± 1,03 ^a	14,76 ± 0,29 ^a	11,46 ± 0,08 ^b

a-b: lettere di apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0.05$ con il test post hoc Tukey).

3.1.3.4. Vitalità cellulare

Dopo l'esposizione di *M. galloprovincialis* a 1 mg/l e 100 mg/l di DEHT, le cellule emolinfatiche hanno mostrato un'elevata stabilità della membrana lisosomiale e un'alta vitalità ($\geq 93\%$) (Tabelle 5 e 6), risultando così non significativamente diverse ($p > 0,05$) dal gruppo di controllo ($\geq 95\%$). Considerazioni simili si possono fare per le cellule della GD provenienti da mitili di controllo e da organismi esposti a 1 mg/l di plastificante ($\geq 97\%$, $p > 0,05$). Le cellule della GD provenienti da mitili DEHT1 hanno mostrato una vitalità significativamente più bassa rispetto al gruppo di controllo dopo la colorazione con NR (98.5% vs. 97.1%, $p < 0,05$), e c'è anche una significatività tra i due gruppi di esposizione DEHT1 e DEHT100 colorati con NR (97.1% vs. 97.9%, $p < 0,05$).

Tabella 5: Effetti dell'esposizione a DEHT1 e DEHT100 sulla vitalità delle cellule dell'emolinfa e della GD di *Mytilus galloprovincialis* valutata con il metodo dell'esclusione del Trypan Blue. I dati sono espressi come % di cellule vitali (media $\pm$ SD di dieci analisi in doppio).

Metodo	Gruppi testati		
dell'esclusione del			
Trypan Blue	Controllo	DEHT1	DEHT100
(TB, %)			
Emociti	95,4 $\pm$ 2,1 ^a	93,6 $\pm$ 4,9 ^a	93,6 $\pm$ 4,9 ^a
Cellule della GD	97,2 $\pm$ 0,5 ^a	98,0 $\pm$ 0,3 ^a	97,5 $\pm$ 0,4 ^a

a-c: lettere apici diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0.05$ con il test post hoc Tukey); le stesse lettere apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0.05$ con il test post hoc Tukey).

Tabella 6: Effetti dell'esposizione a DEHT1 e DEHT100 sulla vitalità delle cellule dell'emolinfa e della GD di *Mytilus galloprovincialis*, valutata mediante il saggio di ritenzione del Rosso Neutro (RN). I dati sono espressi come % di cellule vitali (media $\pm$ SD di dieci analisi in doppio).

Saggio di ritenzione con Rosso Neutro (RN, %)	Gruppi testati		
	Controllo	DEHT1	DEHT100
Emociti	96,9 $\pm$ 1,6 ^a	97,0 $\pm$ 2,9 ^a	96,9 $\pm$ 2,9 ^a
Cellule della GD	98,5 $\pm$ 1,5 ^a	97,1 $\pm$ 1,8 ^b	97,9 $\pm$ 1,4 ^{a,c}

a-c: lettere apici diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0.05$ con il test post hoc Tukey); le stesse lettere apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0.05$ con il test post hoc Tukey).

3.1.3.5. Diminuzione della capacità regolatoria del volume cellulare

In condizioni fisiologiche, le cellule della GD di *M. galloprovincialis* sono in grado di regolare il proprio volume in presenza di una soluzione ipotonica, gonfiandosi e tornando gradualmente al volume originale nel corso del tempo. Nella Figura 8, le cellule della GD del gruppo di controllo hanno raggiunto lentamente il loro volume massimo dopo 10 minuti di esposizione alla soluzione ipotonica. Al contrario, le cellule della GD dei gruppi di esposizione (DEHT1 e DEHT100) hanno mostrato un grado inferiore di rigonfiamento e non sono tornate al loro volume iniziale. In particolare, il volume finale delle cellule DEHT1 era addirittura superiore a quello iniziale e il volume delle cellule DEHT100 era addirittura inferiore a quello delle cellule di controllo. Nel complesso, l'analisi statistica ha mostrato che le cozze DEHT1 e DEHT100 hanno una capacità significativamente inferiore di regolare il volume delle loro cellule della GD rispetto alla condizione di controllo ($p < 0,05$). Inoltre, questa capacità è apparsa significativamente più compromessa con l'aumentare dei livelli di esposizione.

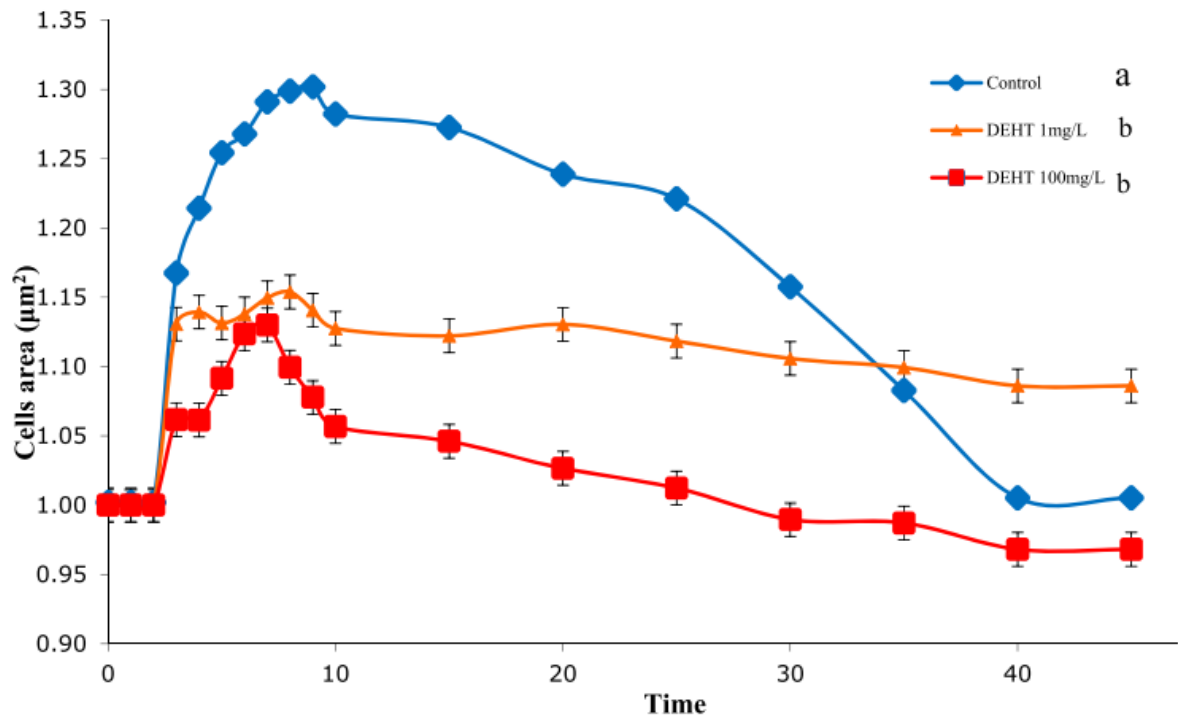
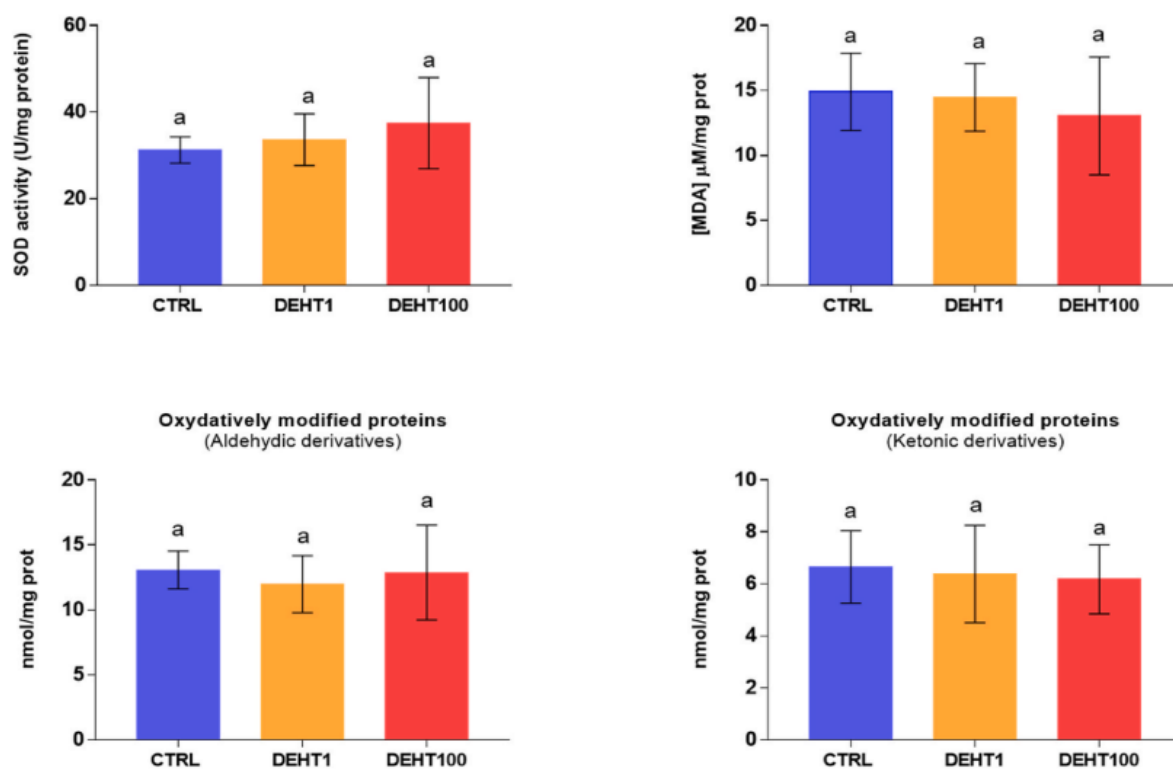


Figura 8: Effetti dell'esposizione a DEHT1 e DEHT100 sulla diminuzione del volume regolatorio delle cellule GD di *Mytilus galloprovincialis*. I dati sono espressi come area media delle cellule $\pm$ SD di misurazioni in triplo. a-b: lettere apicali diverse nella stessa riga indicano valori significativamente 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).

3.1.3.6. Valutazione dello stato ossidativo

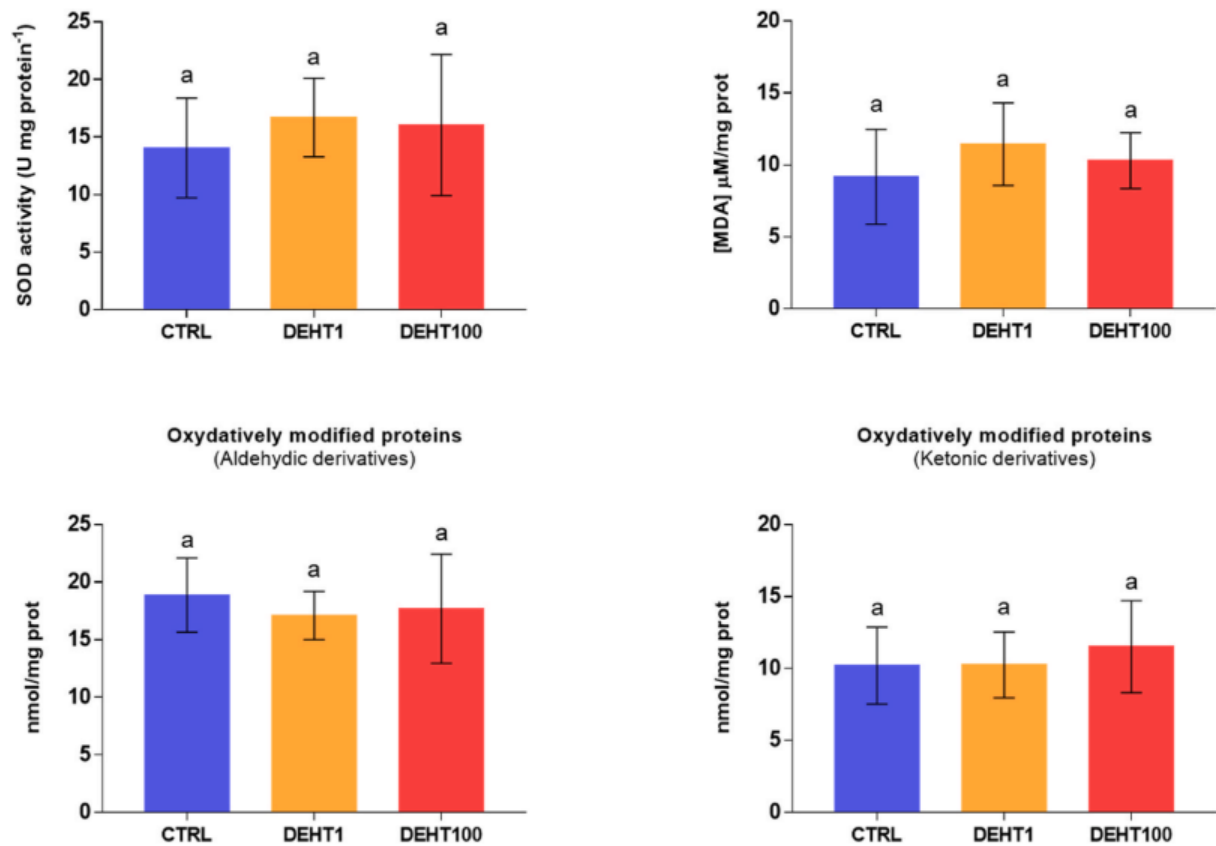
L'attività degli enzimi antiossidanti e i livelli di prodotti ossidativi sono tipicamente utilizzati come indici di un'alterata omeostasi ossidativa, riflettendo così lo stato di salute generale di un organismo (Filice et al., 2023; Lombardo et al., 2022). Di conseguenza, l'attività della SOD e i livelli di LPO e OMP nelle branchie e nella GD di *M. galloprovincialis* esposti al plastificante sono stati misurati e riportati nelle Figure 9 e 10. Sia nelle branchie che nella GD, l'attività della SOD ha mostrato un leggero, ma non significativo ($p > 0.05$), aumento concentrazione-dipendente negli animali esposti al DEHT (branchie: ctrl = 31,27 U/mg prot, DEHT1 = 33,67 U/mg prot, DEHT100 = 38,61 U/mg prot; GD: ctrl = 14,05 U/mg prot, DEHT1 = 16,71 U/mg prot, DEHT100 = 16,05 U/mg prot). Non sono state osservate differenze nei livelli di TBARS e di derivati aldeidici e chetonici, nelle tre condizioni sperimentali.

Figura 9: 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 10: Effetti dell'esposizione a DEHT1 e DEHT100 sull'attività SOD, TBARS e OMP nella GD 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).

3.1.4. Discussioni

Grazie all'elevato volume di produzione e alle numerose applicazioni dei prodotti plastici, frammenti di plastica di diverse dimensioni sono stati rilevati in una vasta gamma di ambienti acquatici. È stato dimostrato che tali frammenti hanno la capacità di bioaccumularsi lungo la catena alimentare, provocando effetti tossici avversi. In questo scenario, sostanze, come gli esteri dell'acido ftalico e i plastificanti non-ftalici, rappresentano gli inquinanti emergenti che sono intrinsecamente legati all'inquinamento da plastica, ma che non sono ancora stati trattati adeguatamente per la gamma di effetti subletali che possono indurre negli organismi acquatici, compresa la specie sentinella *M. galloprovincialis*. In questo studio, abbiamo dimostrato per la prima volta come il plastificante non-ftalico DEHT si possa bioaccumulare nell'organismo di *M. galloprovincialis* e conseguentemente indurre alterazioni nel profilo lipidico e proteico e alcuni processi fisiologici, senza influenzare però i processi legati allo stress ossidativo. Sebbene sia definito come un plastificante non altamente persistente e accumulabile (Bui et al., 2016), le prime prove di bioaccumulo del DEHT negli organismi acquatici risalgono a uno studio di Liu et al., (2019), che ha riscontrato livelli molto bassi di DEHT nei tessuti del serpente d'acqua cinese e della carpa comune provenienti da uno stagno inquinato da rifiuti elettronici (rispettivamente 3,2 µg/kg e 12 µg/kg) (Liu et al., 2019). Più recentemente, il DEHT è stato rilevato a concentrazioni più elevate nelle acque costiere del Mediterraneo (range 0,25-0,93 mg/l Jebara et al., 2021 e range 0,68-1,21 mg/l, Gugliandolo et al., 2020) e nei sedimenti (range: 0,67-2,86 mg/kg dw, Jebara et al., 2021; Souaf et al., 2023), nonché nel biota. Infatti, l'erba marina *Posidonia oceanica* (0,32-11,1 mg/kg dw, Jebara et al., 2021; Souaf et al., 2023), l'orata (14,9-37,7 mg/kg dw), lo squalo *Hexanchus griseus* (fegato: 2,40 mg/kg dw, Salvo et al., 2020) e *M. galloprovincialis* (0,58-5,68 mg/kg dw, Souaf et al., 2023) hanno ragionevolmente bioaccumulato tale NPP a concentrazioni più elevate rispetto alle matrici abiotiche. Chiaramente, questi precedenti studi di campo hanno evidenziato livelli di DEHT molto più bassi rispetto a quelli riscontrati nei mitili esposti a 1 mg/l e 100 mg/l di DEHT in condizioni di laboratorio (rispettivamente, 123,69 mg/kg e 595,13 mg/kg su base fw), ma danno comunque un'idea della presenza ubiquitaria di questo plastificante anche nell'area mediterranea e

dell'urgente necessità di esplorare i suoi effetti tossici sulla vita acquatica a concentrazioni ambientali realistiche.

I macronutrienti, come i lipidi e le proteine, sono coinvolti in molte funzioni vitali degli organismi acquatici. Essi hanno già dimostrato di essere utili marcatori trofici per tracciare le relazioni predatore-preda e definire così le reti alimentari dell'ambiente marino (De Troch et al., 2012; Kelly & Scheibling, 2012), poiché alcuni di essi possono essere ottenuti solo da risorse alimentari peculiari (ad esempio, nutrienti essenziali come gli acidi grassi essenziali). Tuttavia, è stato affermato che essi sono anche buoni biomarcatori della salute dell'ecosistema (Maazouzi et al., 2008) e indicatori di stress in risposta all'esposizione a xenobiotici (Sanchez-Muros et al., 2013; Filimonova et al., 2016). Su questa base, i risultati di questo studio hanno confermato che l'esposizione al DEHT ha causato evidenti alterazioni dei lipidi di *M. galloprovincialis*. Sebbene i lipidi varino a seconda della dieta e delle condizioni ambientali circostanti da cui proviene il mitilo, gli esemplari del gruppo di controllo hanno mostrato un profilo lipidico totale e di acidi grassi del tutto paragonabile a quelli mostrati in precedenti lavori su mitili provenienti dallo stesso sito di raccolta (Costa et al., 2015,2016), in particolare soprattutto per quanto riguarda i principali acidi grassi, SFA, MUFA e PUFA. Tuttavia, dopo esposizione in laboratorio a entrambe le concentrazioni sperimentali di DEHT, le cozze sono state caratterizzate da un aumento dei lipidi totali e il loro profilo di acidi grassi ha mostrato variazioni peculiari a seconda della classe (cioè, diminuzione degli SFA, aumento dei PUFA e invarianza dei MUFA). L'interpretazione di questi risultati si è rivelato un compito impegnativo, poiché, non ci sono stati precedenti tentativi di studiare i cambiamenti del profilo lipidico e dei FA dopo l'esposizione di organismi acquatici al DEHT. Tuttavia, similmente a questo studio, Henderson & Sargent (1983) hanno evidenziato che la trota iridea alimentata con una dieta a base di DEHP (2%) ha mostrato una riduzione del contenuto di acido palmitico nel fegato, nel muscolo e nell'adipe, nonché un aumento degli acidi eicosapentaenoico e docosaesaenoico e una leggera diminuzione dell'acido arachidonico negli stessi tessuti. Variazioni simili sono state riscontrate anche da Morris et al., (1982), che hanno esposto *Gammarus duebeni* (crostaceo marino/salmastro anfipode) a contaminanti lipofili, inclusi i plastificanti PAE. Nonostante la diminuzione del contenuto di acido palmitico, il corpo del crostaceo ha mostrato un aumento del livello percentuale di acido palmitoleico, eicosapentaenoico e

docosaesaenoico (Morris et al., 1982). Nel complesso, si può ipotizzare che, analogamente ai PAE, anche i NPP possano avere un impatto sul lipidoma dell'organismo alterando l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico (ad esempio, geni desaturasi ed elongasi) e nella risposta allo stress (Pradhan et al., 1982). (Pradhan et al., 2018; Saad, 2021; Wei et al., 2023). Ad esempio, i bivalvi sono in grado di effettuare la sintesi *de novo* di alcuni acidi grassi non metilenici (NMIFA), come l'acido diomo- γ -linolenico (C20:3 ω -6), che è sintetizzato a partire dall'acido γ -linolenico (C18:3 ω -6) attivando l'attività dell'elongasi (Freites et al., 2002; Zhukova, 1991). Su questa base, l'aumento dell'acido diomo- γ -linolenico riportato nei mitili esposti a 100 mg/L di DEHT potrebbe essere dovuto a una potenziale compromissione della via di elongazione indotta dal plastificante NPP. Tuttavia, secondo i nostri risultati, gli organismi esposti a una concentrazione ambientale di DEHT (1 mg/L) hanno mostrato livelli di FA paragonabili a quelli dei mitili di controllo, probabilmente a causa del noto fenomeno dell'ormesi (Xu et al., 2021). L'esposizione al DEHT ha indotto un cambiamento significativo anche nel metabolismo proteico di *M. galloprovincialis*. I mitili in condizioni fisiologiche (gruppo di controllo) hanno mostrato un contenuto proteico molto più basso rispetto a quello riportato in letteratura per altre specie di *Mytilus spp.* Ad esempio, la specie *M. edulis* proveniente dalla Cina aveva proteine totali che variavano dal 42,23% al 45,62%, anche se su base dw (Chi et al., 2012). Non sono stati trovati altri studi sulla variazione del contenuto proteico in *M. galloprovincialis*; lo studio riportato da Chi et al., (2012) rappresenta un punto di confronto distante dal nostro, sia in termini di specie che di origine geografica dello studio. Tuttavia, le proteine totali tendevano a diminuire progressivamente dal gruppo di controllo al gruppo DEHT100, con livelli intermedi riscontrati nei mitili DEHT1. Analogamente ai lipidi, il confronto dei nostri dati con la letteratura precedente è alquanto problematico, poiché, non esistono studi precedenti incentrati sui cambiamenti delle proteine dopo l'esposizione di organismi acquatici al DEHT. Tuttavia, analogamente a questo studio, *Daphnia magna* è stata esposta a una concentrazione di DEHP compresa tra 0 e 811 μ g/L mostrano una diminuzione variabile del contenuto proteico, che variava da 241 μ g/daphnia a 128 μ g/daphnia (Knowles et al., 1987).

Per comprendere meglio lo stato di salute dell'organismo modello, sono stati eseguiti test di vitalità cellulare su cellule dell'emolinfa e della ghiandola digerente (Impellitteri et al.,

2022). L'assorbimento di RN da parte degli emociti dei bivalvi avviene attraverso meccanismi quali la pinocitosi o la diffusione passiva attraverso le membrane cellulari. Questo fenomeno viene spesso utilizzato per valutare l'effetto di agenti stressanti sulla stabilità delle membrane lisosomiali nelle cellule dei bivalvi. In effetti, i lisosomi sono organuli che rivestono una grande importanza all'interno delle cellule e sono state condotte numerose ricerche atte a studiare il loro ruolo come organelli bersaglio per il monitoraggio dell'ambiente acquatico in cui vivono questi animali. Un'efficace regolazione di questo processo è probabile che contribuisca alla capacità di alcuni organismi di tollerare ambienti stressanti e inquinati. In quanto una cellula è considerata vitale se la stabilità lisosomiale e la vitalità superano l'80%. I test di vitalità condotti sui mitili esposti al DEHT hanno mostrato una leggera diminuzione della vitalità, anche se non significativa. Solo le cellule della ghiandola digestiva hanno mostrato un'elevata significatività ($p < 0,01$) nel gruppo DEHT100 rispetto al controllo. Lo studio di Choy e collaboratori (2021) ha esaminato l'esposizione di questi organismi alle microfibre di polietilene tereftalato e ha mostrato un aumento dose-dipendente della presenza di emociti apoptotici e necrotici nei mitili esposti rispetto ai controlli. Ciò indica come la presenza di plastificanti influisca sugli emociti, come nel nostro caso, poiché sono le prime cellule coinvolte nelle risposte immunitarie cellulari. Inoltre, l'esposizione a microplastiche $>0-80 \mu\text{m}$ (Von Moos et al., 2012) e a microplastiche di polistirene (González-Soto et al., 2019) ha dimostrato che c'è una riduzione significativa della stabilità della membrana lisosomiale, come nel nostro caso, evidenziata dalla colorazione NR, che va dal 99% nel controllo al 97% nei gruppi esposti, con una significatività di $p \leq 0,01$. Il test di esclusione del colorante TB viene utilizzato per determinare il numero di cellule vitali in una sospensione cellulare. Il principio si fonda sulla capacità delle cellule viventi di mantenere membrane cellulari intatte, che impediscono l'ingresso di specifici coloranti come il TB. Al contrario, le cellule morte o con vitalità compromessa non possiedono questa protezione. Tuttavia, nel nostro caso, i dati relativi al metodo del TB non hanno mostrato variazioni significative nella vitalità cellulare tra i gruppi testati, con una vitalità media di oltre il 90%. Questo risultato non è raro, come dimostra un altro studio che ha analizzato l'impatto delle microplastiche (polistirene, $35-50 \mu\text{m}$) sul nostro modello sperimentale non ha riscontrato cambiamenti significativi nella vitalità cellulare dopo la colorazione con il TB (Impellitteri et al.,

2023a,b). Vale la pena notare che, anche se l'integrità della membrana cellulare può rimanere intatta, la vitalità complessiva della cellula, compresa la sua capacità di crescere o di funzionare, potrebbe comunque essere compromessa.

La ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* svolge un ruolo critico nell'assorbimento e nel metabolismo dei nutrienti essenziali per la sopravvivenza dell'animale. L'epatopancreas sarà quindi l'organo più esposto agli xenobiotici e di conseguenza il più suscettibile di danni. L'esposizione al tereftalato riduce la capacità di queste cellule di regolare il proprio volume cellulare quando vengono esposte a una soluzione ipotonica. Anche alla concentrazione ambientale di DEHT, le cellule non sono riuscite a raggiungere il volume massimo raggiunto dal gruppo di controllo, né a ritornare al volume originale, rimanendo con un'area maggiore di 1 (esattamente $1,09 \mu\text{m}^2$), significatività di $p < 0,05$. Anche le cellule esposte alla concentrazione 100 volte superiore hanno mostrato un andamento irregolare e il loro volume è risultato significativamente ridotto alla fine ($0,97 \mu\text{m}^2$) rispetto al gruppo di controllo ($p < 0,01$). Questi test hanno l'obiettivo di valutare la capacità delle cellule di regolare il proprio volume in risposta a una soluzione ipotonica, importante per determinare la funzionalità e la salute delle cellule. Test simili sono stati condotti su altri contaminanti presenti nell'ambiente acquatico, come ad esempio pesticidi, fungicidi (Ravi et al., 2023; Tresnakova et al., 2023; Stara et al., 2021), metalli pesanti (Torre et al., 2013; Banaee et al., 2022), additivi (Freitas et al., 2020) e farmaci (Pagano et al., 2022; Porretti et al., 2022), per confermare come sostanze tra le più diverse tra loro, possano influenzare la funzionalità delle cellule.

I bivalvi marini dispongono di un efficiente sistema di difesa antiossidante che consente loro di affrontare lo stress ossidativo quando sono esposti a sostanze inquinanti (Freitas et al., 2020; Curpan et al., 2022; Filice et al., 2023; Lombardo et al., 2022). In *M. galloprovincialis*, l'influenza degli inquinanti plastici sull'attività degli enzimi antiossidanti e sui livelli di espressione dei biomarcatori ossidativi è finora poco studiata. I pochi studi disponibili suggeriscono effetti che dipendono strettamente dalla sostanza specifica utilizzata, nonché dall'intensità e dalla durata del trattamento. I dati si riferiscono principalmente a cambiamenti nell'attività degli enzimi antiossidanti, come la glutathione S-transferasi (GST) e la catalasi (CAT), mentre le informazioni sulla perossidazione lipidica e sulla carbonilazione delle proteine sono carenti o addirittura assenti. Nelle cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis*, l'esposizione al bisfenolo A (BPA)

o al perfluorottano sulfonato (PFOS) induce una diversa modulazione di GST e CAT (Balbi et al., 2017). Allo stesso modo, l'esposizione a concentrazioni sub-letali di percolati di plastica ha rivelato la capacità di vari polimeri di influenzare in modo diverso l'attività degli enzimi antiossidanti e i livelli di perossidazione lipidica nelle branchie e nel GD di *M. galloprovincialis* (Capolupo et al., 2021). Un recente lavoro di Andreyeva e collaboratori 2023, riporta che nella GD di *M. galloprovincialis* l'esposizione a DEHP (4,0 mg/L) non ha influenzato l'attività della SOD dopo 24 ore di esposizione, ma ha indotto un aumento di 1,8 volte dopo 48 ore di trattamento (Andreyeva et al., 2023). Nelle nostre condizioni sperimentali, l'esposizione a 1 mg/L o 100 mg/L di DEHT non ha influenzato l'attività dell'enzima SOD nelle branchie e nella GD di *M. galloprovincialis*, così come i livelli di prodotti ossidativi. Questo ci permette di ipotizzare che, alle concentrazioni e al tempo di esposizione al DEHT utilizzati in questo studio, *M. galloprovincialis* non soffre di stress ossidativo. La possibilità che i livelli basali di enzimi antiossidanti siano sufficienti a evitare uno stato ossidativo indotto dal DEHT dovrà essere ulteriormente indagato.

3.1.5 Conclusioni

In conclusione, questo studio ha evidenziato gli effetti negativi dell'esposizione al DEHT sulla specie sentinella *Mytilus galloprovincialis*, compresi i cambiamenti nei parametri fisiologici e biochimici, nonché le alterazioni dei parametri nutrizionali, come il contenuto degli acidi grassi, i lipidi totali e le proteine totali. La presenza di tereftalato nelle acque e nel biota del Mediterraneo è in aumento, il che è preoccupante perché è in grado di accumularsi negli organismi più in alto nella catena alimentare, come gli esseri umani. Ciò sottolinea l'importanza di ridurre l'inquinamento da plastica nei nostri ecosistemi acquatici e di comprendere meglio il suo impatto sulla vita marina e, in ultima analisi, sulla salute umana. Poiché i plastificanti possono alterare il valore nutrizionale dei frutti di mare, che sono un'importante fonte di nutrienti per gli esseri umani, questo tipo di inquinamento può avere conseguenze significative per la salute umana.

Saranno indubbiamente necessari ulteriori studi, anche su altre specie, per comprendere meglio gli effetti tossici di questo composto, non solo da solo, ma anche in combinazione con altri composti chimici, perché purtroppo nell'acqua non esiste un singolo plastificante, ma una varietà di sostanze che possono agire in sinergia o in opposizione l'una con l'altra.

3.2. Sostanze poli- e per-fluoroalchiliche (PFAS) in *Sander lucioperca*: distribuzione nei fiumi delle Fiandre e potenziale impatto sulla salute umana.

3.2.1. Premesse

Le sostanze per- e poli-fluoroalchiliche (PFAS) sono un gruppo ampio ed eterogeneo di composti chimici di sintesi caratterizzate da un legame C-F. Dal 1950, i PFAS sono stati impiegati in un'ampia gamma di settori industriali grazie alle loro proprietà uniche. Secondo l'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE), esistono oltre 4.700 composti (OCSE, 2021), alcuni dei quali sono stati ampiamente utilizzati e per questo estensivamente riportati e studiati dalla comunità scientifica. Sono composti stabili alle alte temperature e molti PFAS presentano proprietà tensioattive, per cui vengono utilizzati anche come repellenti per acqua e grasso. I PFAS sono utilizzati in varie applicazioni, come all'interno di prodotti per la cura della persona e cosmetici (Pütz et al., 2022; Fujii et al., 2013), emulsionanti, agenti umettanti, imballaggi per alimenti o pentole (Curtzwiler et al., 2021), abbigliamento (Muñoz et al., 2024), prodotti medici, schiume antincendio, vernici, adesivi (Glüge et al., 2020; Manojkumar et al., 2023; Stoiber et al., 2020). A causa delle loro proprietà, alcuni PFAS persistono nell'ambiente più a lungo di qualsiasi altra sostanza sintetica e sono pertanto classificati come inquinanti organici persistenti (POP). Inoltre, i PFAS hanno effetti nocivi sulla salute umana, soprattutto quelli a catena lunga (Land et al., 2018; Conder et al., 2008), ma anche sull'ambiente e sugli animali (Cara et al., 2022; Hekster et al., 2003). Nel 2020, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha pubblicato un parere scientifico sui PFAS, ritenendo che l'acido perfluorottano sulfonico (PFOS), l'acido perfluorottanoico (PFOA), l'acido perfluoroesanesolfonico (PFHxS) e l'acido perfluorononanoico (PFNA) possano causare effetti sullo sviluppo e avere effetti negativi sul colesterolo sierico, sul fegato, sul sistema immunitario e sul peso alla nascita. Per facilitare la raccolta di dati sulla presenza di PFAS negli alimenti, dal 2010 la Commissione europea ha adottato la Raccomandazione della Commissione (UE) 2010/161 per il monitoraggio di questi composti negli alimenti (European Commission,

2010). Nel corso del tempo, sono stati effettuati aggiornamenti sui rischi associati ai PFAS, culminati in una valutazione dei rischi associati alla presenza di PFAS sulla salute umana nel 2020 (EFSA, 2020). Alcuni PFAS (ad esempio PFOS, PFOA e PFHxS) sono già stati inclusi nella Convenzione di Stoccolma (Regolamento (UE), 2019; ECHA, 2020). Nel 2022, inoltre, la Commissione ha stabilito una dose tollerabile per la somma di PFOS, PFOA, PFNA e PFHxS pari a 4,4 ng/kg di peso corporeo a settimana, tenendo conto degli effetti sulla salute umana. Con il Regolamento (UE) 2022/2388 del 7 dicembre 2022, la Commissione europea ha stabilito i livelli massimi consentiti per quattro PFAS in una serie di prodotti alimentari, tra cui uova, pesce, crostacei, molluschi, carne e prodotti a base di carne, sia di allevamento che selvatici. Nel 2022 la Commissione ha inoltre adottato la raccomandazione (UE) 2022/1431 sul monitoraggio dei PFAS negli alimenti (Commissione europea e Direzione generale per la salute e la sicurezza alimentare, 2022c). L'obiettivo è quello di raccogliere dati sulla presenza di una vasta gamma di PFAS negli alimenti, rilevanti per l'esposizione umana ai PFAS. Questi dati saranno utilizzati per valutare la necessità di regolamentare i PFAS in altri prodotti specifici. Inoltre, si raccomandano indagini di follow-up sulle fonti di contaminazione. Il recente Regolamento (UE) 2023/915 della Commissione dell'Unione Europea, in vigore dal 25 aprile 2023, stabilisce nuovi limiti per i contaminanti in questi prodotti, sostituendo i regolamenti precedenti (CE, 2023). Dall'inizio degli anni Duemila sono stati rilevati livelli significativi di PFAS sia in acqua dolce che in acqua salata, dall'area del Mediterraneo a tutto il mondo (Wang et al., 2022; Muñoz et al., 2022; Lenka et al., 2022; Goodrow et al., 2020; Teung et al., 2017). Una recente revisione ha esaminato la prevalenza globale di queste sostanze negli oceani e nelle acque costiere. Dallo studio è emerso che queste sostanze sono state rilevate in grandi quantità nelle acque dell'Europa occidentale e dell'Asia orientale (Muir & Miaz, 2021). In particolare, lo studio ha dimostrato un'elevata concentrazione di PFCA e PFSA nel Mare del Nord e nel Mar Baltico e di PFSA nelle acque degli estuari e dei fiumi dell'Europa occidentale. Questa revisione ha evidenziato l'assenza di studi a lungo termine o di follow-up di molte acque, il che può rendere difficile la previsione e il confronto nel tempo. L'analisi dei fiumi svedesi e delle acque marine riceventi ha dimostrato che i PFSA costituiscono il 65% dei PFAS totali rilevati (Nguyen et al., 2017). Inoltre, l'alta densità di popolazione di una determinata area è spesso associata alla presenza di composti specifici, come PFOS, PFOA e PFHxS, che sono i

composti più comunemente utilizzati. Inoltre, esiste una correlazione tra la presenza di alcuni PFAS nei fiumi e nel mare in cui sfociano.

I PFAS possono accumularsi negli organismi acquatici, in particolare i PFAS a catena lunga come i PFOS e l'acido perfluorononanoico (PFNA) (Miranda et al., 2021). Nei predatori acquatici, le concentrazioni possono raggiungere ordini di grandezza superiori a quelle delle loro prede. Studi condotti in Belgio hanno rilevato la presenza di PFAS in varie specie acquatiche, tra cui cozze, pesce persico e anguille (Teunen et al., 2021), nonché in diverse specie di pesci e crostacei del Mare del Nord belga (Cara et al., 2022) e nelle uova di uccelli acquatici (Groffen et al., 2017). I livelli rilevati erano dell'ordine di ng/g. In Francia, il PFOS è risultato il più diffuso nella baia di Marsiglia, mentre nel fiume Rodano sono state misurate concentrazioni notevolmente elevate di acido perfluoroesanoico (PFHxA) (Schmidt et al., 2019). In Catalogna, in Spagna, il PFOA è risultato il composto predominante nelle acque fluviali, seguito da PFOS e acido perfluoropentanoico (PFPeA); i pesci di fiume presentavano livelli molto elevati di PFAS (Pignotti et al., 2017). In un altro studio, incentrato sul fiume Llobregat, l'acido perfluorobutanoico (PFBA), il PFOA e il L-PFOS erano i più abbondanti (Campo et al., 2014). PFHxA, acido perfluoroeptanoico (PFHpA), PFOA, PFHxS e PFOS sono stati rilevati in tutti i campioni e sono i PFAS dominanti nelle acque aperte del Mediterraneo occidentale (Brumovsky et al., 2016). Nella regione del Delta del Fiume delle Perle, nella Cina meridionale, il PFOS è risultato il composto predominante in nove specie di pesci d'acqua dolce, mentre il PFOA è risultato il secondo composto più abbondante. È stato evidenziato che i PFAS con catene di carbonio corte presentano frequenze e concentrazioni di rilevamento molto più elevate rispetto a quelli con catene di carbonio lunghe (Pan et al., 2014).

Lo scopo di questo studio è stato quello di fornire una panoramica completa della presenza di 24 PFAS in *Sander lucioperca*, una specie ittica d'acqua dolce ampiamente pescata dai pescatori locali in diversi fiumi della regione delle Fiandre, nel Belgio settentrionale. Poiché questi pesci sono consumati direttamente dai pescatori e dalle loro famiglie, è stata condotta una valutazione per determinare il potenziale impatto sulla salute umana. A tal fine, è stata calcolata i livelli di rischio sull'uomo tramite i livelli minimi di rischio (LMR) sia dei singoli 4 PFAS regolamentati (PFOS, PFOA, PFNA e PFHxS) che della loro sommatoria. I risultati presentati in questo studio forniscono informazioni

essenziali sullo stato di contaminazione dei PFAS tradizionali ed emergenti, consentendo un confronto con studi precedenti condotti nella stessa area geografica per evidenziare la tendenza della presenza di questi composti chimici in una specie ittica commestibile del Belgio settentrionale.

L'attività di ricerca è stata sottoposta ad un comitato di revisione per la pubblicazione di un articolo su rivista indicizzata del quale si riportano le informazioni essenziali, figure e tabelle.

3.2.1.1. Regolamenti e normative Europee

Visto il numero sempre più crescente di PFAS sintetizzati e il loro facile utilizzo in un'ampia gamma di prodotti, ma anche di studi che ne evidenziano gli effetti avversi su diverse specie animali, incluso l'uomo, sorge spontaneo la necessità di regolamentare la presenza di questi composti. Le autorità pubbliche dell'Unione Europea e degli Stati membri sono impegnate nel rendere più rigorosi i regolamenti sui PFAS all'interno dell'UE, con l'obiettivo di ridurre la presenza sia nell'ambiente che nella filiera alimentare. Tali misure sono volte a mitigare le potenziali conseguenze a lungo termine sulla salute umana e sull'ambiente derivanti dall'esposizione a queste sostanze.

Partendo dagli anni '30 e '40 degli anni Novanta che inizia l'era dei PFAS con la sintesi del politetrafluoroetilene (PTFEE) conosciuto come Teflon. Un composto rivoluzionario per l'industria e che è stato descritto come "estremamente resistente al calore e antiaderente". A partire dagli anni '50, l'invenzione dei PFAS si rivelò un successo significativo. Diverse tipologie di PFAS iniziarono a essere prodotte a livello globale, dimostrandosi una scoperta rivoluzionaria per il settore industriale. Questi composti chimici vennero (e vengono tuttora) utilizzati nella produzione di una vasta gamma di prodotti. Tuttavia, non tutto era perfetto come sembrava inizialmente. Nel 1998, l'Agenzia per la Protezione Ambientale degli Stati Uniti (EPA) ha espresso preoccupazione per i potenziali rischi associati ai PFAS, etichettandoli come "forever chemicals". Questi composti di origine umana sono noti per la loro persistenza nell'ambiente, poiché non si degradano mai una volta rilasciati e tendono ad accumularsi nei corpi. E da qui iniziarono gli studi e le ricerche, nel 2002 il Dipartimento di Sanità del Minnesota scopre una contaminazione delle acque sotterranee da PFAS, influenzando le forniture di acqua

potabile di oltre 140.000 residenti. Perché l'Europa inizi ad agire passeranno ancora degli anni. Infatti, solamente nel 2006 che si avvieranno i primi progetti per lo studio della presenza di perfluorati nelle acque, con il progetto PERFORCE. Il progetto prevedeva la raccolta di campioni di acque provenienti dai principali fiumi d'Europa e il rilevamento dei livelli di PFCA (McLachlan et al., 2007). L'analisi ha rivelato alti livelli in quasi tutta Europa, con la concentrazione più alta misurata è stata di 200 ng/L per il perfluorooottanoato (PFOA) nel fiume Po (Italia).

Solamente nel 2006 il PFOS è stato il primo PFAS regolamentato dalla Commissione Europea (Direttiva 2006/122/CE) (UE, 2006). Nel 2009, il PFOS e i suoi derivati sono stati inseriti nell'Allegato B della Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (Persistent Organic Pollutants, POPs) con l'acido perfluorooottanoico (PFOA) che seguirà nel 2019, limitando la loro produzione e utilizzo (UNEP, 2009; UNEP, 2019 a,b). Da lì in poi è stato un crescendo di restrizioni sull'uso e sulle quantità limite che si possono ritrovare in determinati prodotti. Questi passaggi pur essendo gradualmente, rappresentano un'evoluzione significativa nella regolamentazione dei PFAS, riflettendo una crescente consapevolezza dei rischi associati a queste sostanze chimiche.

L'Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) pubblica i Profili tossicologici, guide di riferimento che forniscono informazioni su una sostanza tossica, come le sue proprietà chimiche e fisiche, le fonti di esposizione, le vie di esposizione, i livelli di rischio minimo, i bambini e gli effetti sulla salute. Le informazioni fornite includono:

- le proprietà chimiche e fisiche;
- le fonti di esposizione;
- le vie di esposizione;
- i livelli minimi di rischio;
- la salute dei bambini e gli effetti generali sulla salute;
- il modo in cui la sostanza potrebbe interagire nell'ambiente.

L'ATSDR ha pubblicato una bozza di profilo tossicologico che riassume le conoscenze sui PFAS e offre un'interpretazione degli ultimi studi pubblicati su questa classe di sostanze (ATSDR, 2018). Il Livello Minimo di Rischio (LMR) indica la quantità massima di una sostanza chimica che una persona può introdurre nell'organismo tramite il cibo, le

bevande o l'aria senza correre un rischio significativo per la salute. Gli LMR sono intesi come uno strumento per aiutare i professionisti della salute pubblica a individuare le aree e le popolazioni che potrebbero essere a rischio di effetti sulla salute dovuti all'esposizione a una particolare sostanza chimica. È importante notare che gli LMR sono uno strumento di screening che aiuta a identificare le esposizioni potenzialmente pericolose per la salute umana. Un'esposizione superiore agli LMR non significa necessariamente che si verificheranno problemi di salute. Al contrario, può essere un segnale per i valutatori della salute per esaminare più da vicino un particolare sito in cui possono essere identificate esposizioni. Gli LMR non definiscono livelli normativi o di azione per l'ATSDR.

In linea con il regolamento REACH (Registrazione, Valutazione, Autorizzazione e Restrizione delle Sostanze Chimiche), pilastro fondamentale della normativa europea sulla gestione delle sostanze chimiche, l'Unione Europea ha adottato nuove misure volte a eliminare gradualmente le sostanze nocive presenti in numerosi prodotti di uso quotidiano.

Nel 2020 l'EFSA ha stabilito una nuova soglia di sicurezza per i PFAS negli alimenti, inclusi acido perfluorooottanoico (PFOA), perfluorooottano sulfonato (PFOS), acido perfluorononanoico (PFNA) e acido perfluoroesano sulfonico (PFHxS). La dose settimanale tollerabile di gruppo per questi quattro PFAS è fissata a 4,4 nanogrammi per chilogrammo di peso corporeo alla settimana.

Nel 2022, l'Unione Europea ha pubblicato il Regolamento (UE) 2022/1428 recante le linee guida sui metodi di campionamento e di analisi sui prodotti alimentari (Commission Regulation (EU), 2022), e la Raccomandazione (EU) 2022/1431, per il monitoraggio in totale 28 PFAS in matrici alimentari.

Limite di:

- 0,010 µg/kg per PFOS, PFOA, 0,005 µg/kg per PFNA e 0,015 µg/kg per PFHxS in frutta, ortaggi, radici e tuberi amilacei;
- 1,5 µg/kg per PFOS, 0,010 µg/kg per PFOA, 0,005 µg/kg per PFNA e 0,015 µg/kg per PFHxS nei funghi selvatici;
- 0,020 µg/kg per PFOS, 0,010 µg/kg per PFOA, 0,050 µg/kg per PFNA e 0,060 µg/kg per PFHxS nel latte;

- 0.050 µg/kg PFOS, PFOA, PFNA e PFHxS in alimenti destinati ai lattanti e ai bambini nella prima infanzia.

Il Regolamento (EU) 2022/2388 modifica il Regolamento (CE) 1881/2006 in relazione ai tenori massimi di sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) in determinati prodotti alimentari. Questa modifica stabilisce nuovi limiti per la presenza di PFAS negli alimenti, con l'obiettivo di proteggere la salute dei consumatori e garantire la sicurezza alimentare. Settando dei tenori massimi espressi in µg/kg di peso fresco per PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS e per la loro somma (Commission Regulation (EU), 2022).

L'ultima normativa adottata dall'Unione Europea impone nuove e rigorose restrizioni sull'utilizzo dell'acido perfluoroesanoico (PFHxA) (Commission Regulation (EU), 2024). Il divieto riguarderà la vendita e l'uso del PFHxA in una concentrazione pari o superiore a 25 parti per bilione (ppb) per la somma del PFHxA e dei suoi sali, o pari a 1.000 ppb per la somma delle sostanze correlate al PFHxA, misurata in materiali. Questa misura si applicherà a una vasta gamma di prodotti di consumo quotidiano, tra cui: tessuti, materiali per calzature, imballaggi alimentari, prodotti per la cura della persona e cosmetici, altri prodotti.

Nel lavoro di Reinikainen et al., (2024) vengono esaminati criticamente i più recenti sviluppi europei nella valutazione del rischio normativo dei PFAS, con un focus sul confronto e sull'analisi di specifiche soglie dell'UE emanate per queste sostanze, ovvero i livelli di esposizione o le concentrazioni di PFAS negli ambienti che sono considerati sicuri o che innescano specifiche azioni di gestione. Lo studio ha messo in luce le debolezze e le incoerenze degli attuali approcci basati sul rischio dei PFAS, evidenziando come la moltitudine di leggi spesso renda difficile capire quali limiti siano davvero importanti.

3.2.1.2. I PFAS nei Prodotti per la cura della Persona

Come già detto i PFAS sono sostanze di ampio e facile uso industriale e sono stati ritrovati praticamente in tutti i tipi di prodotti, sia che siano stati aggiunti volontariamente nella formulazione sia come contaminanti. Ciò vale anche per i prodotti per la cura della persona. Una varietà di PFAS viene aggiunta intenzionalmente ai prodotti di consumo (soprattutto come emulsionanti, antistatici, stabilizzanti, tensioattivi, filmogeni, regolatori di viscosità e solventi), ma può essere presente anche involontariamente come impurità e/o prodotto di degradazione (Brinch et al., 2018). Fujii et al., (2013) sono stati i primi a misurare i PFAS in 24 cosmetici e prodotti per la cura della persona e hanno scoperto che l'88% di essi conteneva PFCA, con concentrazioni totali di PFCA fino a 19 µg/g negli schermi solari e fino a 5,9 µg/g in altri prodotti cosmetici (Fujii et al., 2013). Schultes et al., (2018) hanno segnalato la presenza di PFAS target in un'ampia gamma di prodotti cosmetici provenienti dal mercato svedese, mostrando concentrazioni elevate di PFCA e precursori di PFCA in alcuni campioni e concentrazioni ancora più elevate di fluoro totale (TF) e organofluoro estraibile (EOF) (Schultes et al., 2018). Più recentemente, uno studio su 231 cosmetici provenienti da Canada e Stati Uniti ha riportato che oltre il 50% conteneva livelli elevati di TF (Whitehead et al., 2021). Nello studio di Pütz et al., (2022), i ricercatori hanno stimato per la prima volta le emissioni di PFAS derivanti dall'uso di cosmetici nell'Area Economica Europea (EEA), esclusi Liechtenstein e Islanda. Hanno identificato 170 strutture contenenti PFAS nei cosmetici sul mercato europeo e analizzato un campione di 45 cosmetici per determinare la concentrazione totale di fluoro (TF), fluoro organico estraibile (EOF) e PFAS target. Keawmanee et al., (2024) hanno esaminato la concentrazione e valutato il rischio per la salute associato alla presenza di PFAS nei cosmetici e nei prodotti per la cura della persona. I ricercatori hanno riscontrato che le concentrazioni totali di PFAS nei cosmetici variavano da 1,98 a 706,75 ng/g, con la presenza di composti quali PFBS, PFOA e PFPA in alte concentrazioni. Nonostante i rischi per la salute siano stati considerati bassi, la persistenza e la bioaccumulazione dei PFAS nei cosmetici rappresentano una preoccupazione.

Data l'ampiezza della superficie cutanea (22 m²) (Godin et al., 2007) e l'uso generalizzato di PFAS, molti di essi risultano essere presenti nei cosmetici sono ionici o polimerici, entrambi poco assorbiti dalla pelle (Franko et al., 2012). L'assorbimento cutaneo di PFAS

non ionizzabili e a basso peso molecolare è in gran parte sconosciuto. Nel 2024, Namazkar et al., (2024), hanno scoperto che i PFAS elencati, come gli esteri polifluoroalchilici fosfati (PAPs), mostrano una bassa bioaccessibilità, mentre i residui di acidi perfluoroalchilici (PFCAs) hanno una bioaccessibilità significativamente maggiore, variando dal 43% al 76%. Questo studio fornisce nuove informazioni sui loro meccanismi di assorbimento dermico (Namazkar et al., 2024). Oltre alla potenziale esposizione attraverso l'assorbimento cutaneo e l'ingestione di PFAS nei cosmetici, i PFAS utilizzati in questi prodotti possono rappresentare un rischio per l'ambiente. Le emissioni nell'ambiente possono avvenire durante la produzione e l'uso dei cosmetici o dopo l'uso, quando i prodotti vengono rimossi dalla pelle o dai capelli, o a seguito dello smaltimento dei contenitori dopo l'uso.

3.2.2. Materiali e Metodi

3.2.2.1. Campionamento

I 79 campioni di *Sander lucioperca* sono stati raccolti in 40 diverse aree di campionamento nelle Fiandre, la regione settentrionale del Belgio. Sono distribuiti come segue, con i numeri tra parentesi che corrispondono alle località di campionamento indicate sulla mappa in Figura 11: Bovenschelde (1,2), Zeeschelde (3,4,5,14,15,19), Kanaal Gent - Oostende, (6) Nete (7), Dijle (8, 34), Leopoldkanaal (9,10), Rupel (11,12,13), Kanaal Brussel Charleroi (16,26), Moervaart (17), Polder Van Lier (18), Kanaal Ieper Ijzer (20), Ijzer (21,22), Havendok (23), Albertkanaal (24,25), Leie (27), Maasplas (28), Schulensmeer (29), Kanaal Roeselar-Leie (30, 36), Kanaal Kortrijk-Bossuit (31), Willebroekse Vaart (32), Schelde (33) e Kanaal Gent-Terneuzen (35) (Figura 11). Queste località sono caratterizzate da canali, fiumi e torrenti e presentano una variazione del livello di pressione antropica (ad esempio, aree urbane, rurali e industriali).

L'Istituto di ricerca per la natura e le foreste (INBO) ha effettuato il campionamento di *Sander lucioperca* tra luglio 2022 e marzo 2023. I pesci raccolti avevano una lunghezza compresa tra 17 e 71 cm (media 36,50 cm) e un peso compreso tra 17 e 3330 g (peso medio 578,53 g). I pesci sono stati congelati per il trasporto e conservati a -20 °C fino alla successiva analisi.

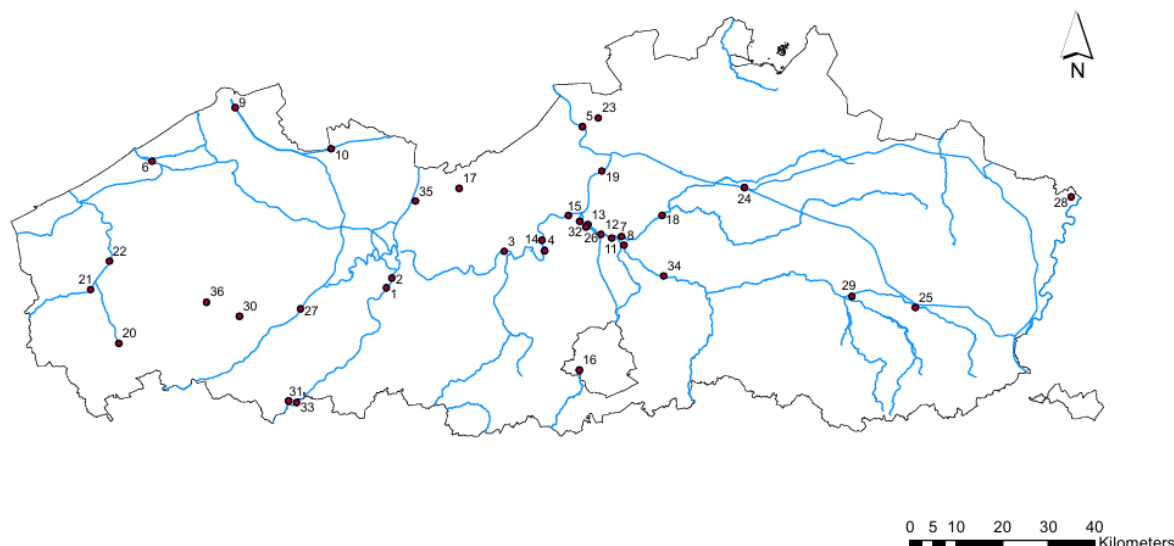


Figura 11: mappa della distribuzione dei campioni di *Sander luciperca* nell'area delle fiandre, Belgio.

3.2.2.2. Preparazione ed estrazione dei PFAS dai campioni

Durante la manipolazione e l'analisi dei campioni, è stata prestata particolare attenzione a ridurre al minimo la contaminazione da PFAS nel laboratorio. Tutte le parti del miscelatore a contatto con i campioni (coltello e tagliere) sono state accuratamente risciacquate con acqua saponata e ACN PFAS-free. Per precauzione, sono stati utilizzati solo contenitori e taglieri in acciaio inossidabile. Per i pesci interi sono state rimosse la testa, la pelle, la coda e le interiora. Tutti i campioni analitici sono stati macinati e/o omogeneizzati. Quando possibile, i campioni sono stati sminuzzati con un coltello di acciaio inossidabile, quindi macinati in modo uniforme con un mixer Resch 200 (Verder Scientific GmbH & Co, Aartselaar, Belgio).

La procedura di omogeneizzazione dei campioni è stata la stessa per tutti i 59 campioni; sono stati omogeneizzati utilizzando un mixer Resch 200 (Verder Scientific GmbH & Co, Aartselaar, Belgio). I campioni macinati sono stati suddivisi in contenitori di polipropilene (PP) e conservati in un congelatore fino al momento dell'analisi.

L'Istituto Sciensano ha sviluppato e validato un metodo per la quantificazione dei 24 PFAS in esame. In breve, $5,00 \pm 0,02$ g di campioni macinati e omogeneizzati sono stati pesati in una provetta Falcon da 50 ml con 2 ng di soluzione IL-IS PFAS. Sui campioni

di tessuto è stata eseguita un'estrazione basata su QuEChERS: sono stati aggiunti 10 ml di acqua Milli-Q alla provetta Falcon e i campioni sono stati agitati per 10 minuti con un agitatore Multi Reax 2. L'agitazione è stata ripetuta per 20 minuti dopo l'analisi di laboratorio. L'agitazione è stata ripetuta per 20 minuti dopo l'aggiunta di 10 ml di ACN/NH₄OH (99:1, v/v). Quindi sono stati aggiunti 0,5 g di NaCl e 4 g di MgSO₄ e i campioni sono stati agitati vigorosamente a mano per 1 minuto. I falconi sono stati quindi centrifugati a 10.000 rpm per 10 minuti a 5 °C. Il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta Falcon da 50 ml ed è stata eseguita una fase di pulizia utilizzando SPE SupelClean Envicarb 500 mg, che sono stati condizionati con 6 ml di MeOH/NH₄OH (95:5, v/v). Quindi il campione è stato fatto passare in una nuova Falcon e la cartuccia è stata lavata con una soluzione di MeOH/acido acetico (98:2, v/v). Il volume è stato portato a 50 ml con acqua Milli-Q e il pH è stato portato a 3 con acido formico. Il secondo clean-up è stato eseguito utilizzando SPE Strata X-AW 500 mg. Prima è stato condizionato con 4 ml di MeOH/NH₄OH (95:5, v/v) per rimuovere eventuali PFAS dallo SPE, poi 4 ml di MeOH e 4 ml di acqua Milli-Q. Il campione (50 ml) è stato iniettato goccia a goccia nella cartuccia a un vuoto di circa 200 mbar. Le cartucce sono state poi risciacquate con 6 ml di acqua (20 mM acetato di ammonio) e 6 ml di MeOH/acido acetico (98:2, v/v). Le cartucce sono state poi essiccate per 5 minuti a una pressione di circa 300 mbar. L'eluizione è stata eseguita con 12 ml di MeOH/NH₄OH (95:5, v/v) in provette Falcon da 15 ml. Gli estratti sono stati evaporati sotto una corrente di azoto a meno di 100 µl e sono stati aggiunti 2 ng di standard esterno (iniezione MS) (ES). L'estratto finale è stato poi ricostituito in 500 µl di metanolo, centrifugato a 4000 rpm per 5 minuti a 5 °C e trasferito in una fiala di autofiltrazione PP da 0.2 µm, prima dell'analisi LC-HRMS.

L'analisi è stata eseguita su un UPLC VanquishTM (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) accoppiato a uno spettrometro di massa Q-Exactive FocusTM Orbitrap (ThermoFisher Scientific) in modalità di ionizzazione elettrospray negativa (ESI). Sono state utilizzate una precolonna Vanguard AcquityTM BEH C18 (2,1 x 5 mm, 1,7 µm) (Waters, Milford, MA) e una colonna analitica BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm) (Waters) a 55 °C. Il sistema LC era dotato di una colonna di isolamento in fase inversa AcquityTM (2.1 x 50 mm) installata dopo la pompa LC e prima della valvola di iniezione per compensare la contaminazione di fondo della pompa LC, del degasatore e delle fasi mobili. Il volume di iniezione era di 5 µL e un gradiente binario è stato erogato a 0,4 mL/min. Il gradiente LC

è iniziato con una pausa isocratica di 1 minuto al 20% della fase mobile B, è aumentato linearmente per 8.5 minuti fino al 100% della fase mobile B, seguito da una pausa isocratica di 1 minuto prima di tornare alla percentuale iniziale in 0,1 minuti e mantenuta per altri 2.4 minuti, per un tempo di esecuzione totale di 13 minuti. Lo spettrometro di massa è stato utilizzato in modalità full scan parallel reaction monitoring (FS-PRM). La modalità PRM acquisisce scansioni MS/MS basate su un elenco di inclusione che copre tutti gli analiti nativi, gli isotopi di sostituzione e gli isotopi di sostituzione esterna come un triplo quadrupolo. La risoluzione è stata impostata a 35.000 per la modalità FS e a 17.500 per la modalità PRM.

3.2.2.3. Valutazione del rischio sull'uomo

La quantità massima di pesce consumabile quotidianamente senza correre rischi per la salute è stata calcolata per PFOA, PFNA, PFHxS e PFOS sulla base dei livelli minimi di rischio (LMR) proposti dall'ATSDR (Agency for Toxic Substances, Disease Registry, 2019) e sulla base dei livelli di LMR del gruppo di esperti scientifici dell'EFSA sui Contaminanti nella catena alimentare (CONTAM) (EFSA, 2020; Teunen et al., 2021). Il valore MRL dell'EFSA è stato determinato sulla base della somma di PFOA, PFOS, PFHxS e PFNA. Visto che alcuni valori erano al di sotto del limite di quantificazione (LOQ), per quei valori si è adottato come misura il LOD/2. I valori LMR sono proposti per un'assunzione orale intermedia. La quantità massima di pesce che può essere consumata ogni giorno senza correre rischi per la salute è stata calcolata sulla base della Formula di qui seguito riportata:

$$Q = \frac{W * M}{C}$$

Dove:

- Q è la quantità massima di pesce contaminato che una persona può consumare al giorno senza rischiare possibili effetti sulla salute (g/giorno),
- W è il peso di una persona (kg),
- M è l'LMR per l'assunzione orale della sostanza (ng/kg di peso corporeo/giorno),
- C è la concentrazione osservata di una sostanza in una località (ng/g ww).

3.2.2.4. Statistica

Le differenze significative nelle medie dei singoli contaminanti tra i siti sono state analizzate utilizzando l'ANOVA a una via e il test post hoc Tukey. Per l'analisi multivariata è stato utilizzato il pacchetto software SPSS 13.0 per Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). I metodi statistici sono stati eseguiti sulla matrice multivariata iniziale in cui i casi (60) erano i campioni analizzati con $n \geq 3$ e le variabili (10) erano i valori di PFAS (PFNA, PFDA, PFUDA, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxS, PFHpS, PFOS e PFDS) che erano superiori al LOQ in più del 75% dei campioni. Se solo alcuni campioni presentavano concentrazioni inferiori al LOQ, quest'ultimo è stato sostituito dal valore LOD/2 (Škrbić et al., 2010). Il set di dati è stato suddiviso in 11 gruppi geografici (Zeeschelde, Nete, Dijle, Leopoldkanaal, Rupel, Kanaal Brussel Charleroi, Polder Van Lier, Ijzer, Havendok, Albertkanaal e Kanaal Roeselare-Leie). Inizialmente, è stato applicato il test non parametrico di Kruskal-Wallis per evidenziare le differenze tra i dieci gruppi. Successivamente, l'insieme dei dati è stato normalizzato per ottenere l'indipendenza dei fattori di scala delle diverse variabili (Marengo & Aceto, 2003) e, infine, è stata eseguita un'analisi fattoriale con estrazione delle componenti principali per cercare di differenziare i campioni provenienti da gruppi diversi in base ai valori delle variabili.

3.2.3. Risultati

3.2.3.1. Concentrazione dei PFAS

Le concentrazioni medie e gli intervalli di PFAS nei siti sono presentati nella Tabella 7 per ciascuna area. Dall'analisi dei risultati è emerso che PFOA, PFNA, PFDA, PFUDA, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxS, PFHpS, PFOS, PFNS, PFDS e PFDoS sono stati rilevati in più del 50% dei siti di campionamento, mentre PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFUDS, PFTrds, F53B maggiore, F53B minore, HFPO-DA e DONA sono stati rilevati sotto il 50% dei siti di campionamento. In particolare, PFOA, PFHxS, PFDoA e PFUDA sono stati rilevati in tutti i siti di campionamento, mentre PFDA, PFHpS, PFNA e PFTrDA in oltre il 90% dei campioni. PFTeDA e PFDS sono stati rilevati in almeno l'80% dei siti di campionamento, seguiti da PFDoS e PFNS nel 60% dei siti, mentre PFUDS e PFOA sono stati identificati nel 40% dei campioni, seguiti da PFTrDS e HFPO-DA, PFBA, PFHpA, PFBS, PFPeA, PFHxA, PFPeS, F53B minore e maggiore e DONA, presenti nel 8-1,3% dei campioni analizzati (Figura 12).

Sono state osservate differenze significative ($p < 0,05$) nelle concentrazioni di PFAS tra le diverse aree di campionamento per PFOA, PFNA, PFDA, PFUDA, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxS, PFOS, PFNS e PFDS. Al contrario, i restanti composti (PFHxS e PFDoS) non hanno mostrato differenze significative ($p > 0,05$) tra le diverse aree di campionamento.

I campioni raccolti da Leopoldkanaal hanno mostrato il contenuto medio più alto di PFNA (268,75 pg/g). I livelli medi più elevati di PFDA sono stati riscontrati nei campioni raccolti da Kanaal Gent-Oostende (1779,71 pg/g), Leopoldkanaal (1765,23 pg/g) e Kanaal Roeselare-Leie (1635,70 pg/g). Il contenuto di PFTrDA ha mostrato i valori più alti nei campioni di Kanal Gent-Terneuzen (2104,95 pg/g). Al contrario, i campioni di Bovenschelde e Kanaal Brussel-Charleroi hanno mostrato le più alte concentrazioni medie di PFTeDA (rispettivamente 986,29 e 785,02 pg/g). Il sito di Havendok ha mostrato i livelli più elevati di PFHxS (321,62 pg/g) e di PFOA (75,23 pg/g). L'analisi dei dati ha rivelato che il contenuto medio più alto era del PFOS, in particolare nei campioni del Polder Van Lier era di 20656,00 pg/g, valore che differiva da quello degli altri campioni (da 5410,10 pg/g a 20656,00 pg/g). Il PFNS mostrava un contenuto medio compreso tra <LOQ (Nete, Dijle, Leopoldkanaal, Rupel) e 63,02 pg/g in Polder Van Lier. Kanaal Gent-Terneuzen

mostrava il più alto contenuto medio di PFDS (210,65 pg/g) mentre quello più basso (<LOQ in Leopoldkanaal e Nete).

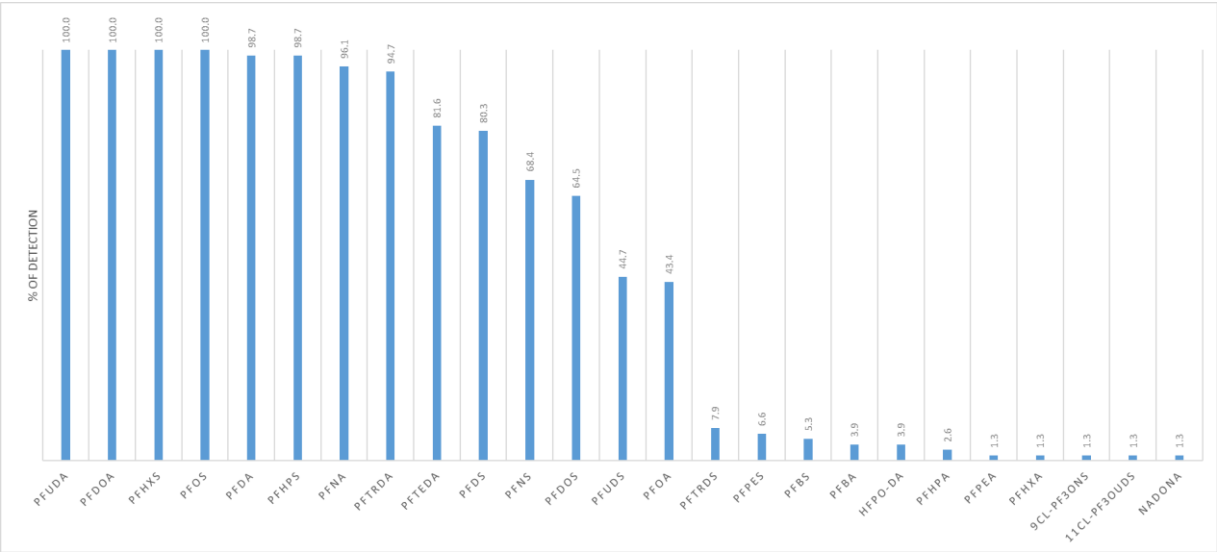


Figura 12: Percentuale di rilevazione di ogni composto contenuto in ogni località analizzata.

Tabella 7: Limiti individuali di quantificazione (LOQ; pg/g ww) e concentrazioni (range; pg/g ww) per gli analiti target in Sander lucioperca nell'area delle Fiandre.

Region	Compound	PFOA	PFNA	PFDA	PFUDA	PFDaA	PFTrDA	PFTeDA	PFHxS	PFHpS	PFOS	PFNS	PFDS	PFDoS
	LOQ (pg/g)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Bovenshelde (n=2)	min	46,56	25,83	<LOQ	1093,82	1795,35	776,56	975,04	41,13	20,88	7140,49	52,06	20,00	34,62
	max	46,59	31,18	808,81	1099,23	1980,26	863,07	997,54	43,63	21,80	10528,51	61,13	32,50	32,12
Zeeschelde (n=18)	min	<LOQ	19,44	218,31	177,55	193,85	116,40	49,43	90,67	45,39	6080,30	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	max	83,44	130,12	976,93	938,29	2746,17	869,57	915,30	1260,03	673,55	37217,59	91,91	138,24	239,05
Kanaal Gent- Ostende (n=2)	min	<LOQ	71,91	1760,95	1761,70	1158,17	191,16	<LOQ	93,27	45,66	8403,13	<LOQ	60,00	24,49
	max	73,51	352,44	1798,47	3735,98	3053,27	1831,21	1175,40	117,31	137,25	10270,26	49,60	95,49	66,40
Nete (n=3)	min	<LOQ	<LOQ	353,06	195,01	362,45	<LOQ	<LOQ	31,44	16,85	4691,75	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	max	41,63	84,18	1682,88	447,22	1051,03	451,25	17,50	131,88	54,00	8538,48	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Dijle (n=4)	min	<LOQ	21,40	461,70	312,42	691,06	74,33	<LOQ	31,90	20,70	5002,00	<LOQ	2,50	<LOQ
	max	29,12	60,24	694,68	386,85	1245,83	490,40	1747,42	114,13	52,30	8228,78	<LOQ	73,60	184,70
Leopoldkanaal (n=3)	min	<LOQ	162,00	547,84	419,00	49,43	<LOQ	<LOQ	22,92	34,97	5624,39	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	max	34,95	485,47	3475,10	981,41	536,20	<LOQ	<LOQ	74,35	47,58	8656,71	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Rupel (n=6)	min	<LOQ	39,49	482,60	292,34	602,84	430,52	421,44	73,10	38,46	10146,65	<LOQ	29,65	<LOQ
	max	54,53	96,42	693,63	584,12	1893,65	704,85	1551,73	234,58	91,86	13476,04	31,58	108,43	93,85
Kanaal Brussel Charleroi (n=7)	min	<LOQ	<LOQ	108,74	71,88	111,60	32,31	<LOQ	28,19	<LOQ	2946,87	22,30	22,51	<LOQ
	max	61,27	87,20	912,90	652,90	1547,50	977,80	1189,93	358,60	108,60	25368,11	81,47	191,30	179,80
Polder Van Lier (n=4)	min	<LOQ	17,89	817,35	374,51	436,20	65,25	<LOQ	20,46	27,10	16620,96	21,17	32,88	<LOQ
	max	18,80	45,49	2403,41	724,87	723,47	182,15	90,37	28,25	40,90	23754,78	123,88	107,74	22,75
Ijzer (n=4)	min	62,50	83,97	1109,34	310,47	320,75	89,72	81,41	28,11	21,49	4122,07	16,96	18,68	<LOQ
	max	122,50	177,78	1867,44	863,28	1137,33	222,92	363,11	30,31	37,25	11820,10	95,56	124,67	40,81
Havendok (n=3)	min	54,10	24,49	306,27	343,92	505,67	259,29	75,48	273,52	55,76	9385,28	33,92	41,95	30,76
	max	82,78	40,19	422,71	435,13	832,43	488,60	631,15	340,84	81,65	13020,15	52,36	80,40	94,46
Albertkanaal (n=4)	min	<LOQ	37,28	306,28	295,57	648,87	345,29	589,23	25,12	13,59	2946,20	<LOQ	41,48	19,98
	max	20,72	109,00	889,39	465,44	1031,83	503,65	727,12	36,07	59,65	11627,42	56,40	79,76	70,85
	min	<LOQ	<LOQ	552,30	362,30	1067,10	600,30	347,20	29,60	<LOQ	4068,90	<LOQ	30,60	<LOQ

Kanaal Roeselare-Leie (n=5)	max	<LOQ	86,00	2397,00	1351,10	2909,10	1467,00	1106,50	121,90	28,20	11449,00	17,90	51,50	27,30
Kanaal Kortrijk-Bossuit (n=2)	min	<LOQ	29,00	1091,10	787,40	1411,50	880,40	624,20	40,70	28,90	13056,00	26,40	115,60	37,90
	max	<LOQ	36,30	1183,90	817,00	1470,00	965,90	629,50	57,60	38,60	16090,10	34,90	152,00	45,20
Kanaal Gent-Terneuzen (n=2)	min	2,50	88,70	802,00	1666,00	1686,00	1427,20	387,90	189,20	69,80	10048,30	29,40	196,80	81,50
	max	2,50	154,10	2411,00	4523,30	3700,60	2782,70	721,50	483,00	170,30	22082,30	49,50	224,50	124,30
p-value		< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05

Solo i composti rilevati in più del 50% dei campioni sono stati inclusi in queste analisi. I valori di p in grassetto sono statisticamente significativi ($p < 0.05$).

3.2.3.2. *Rischi per la salute umana*

Sulla base delle concentrazioni medie rilevate nel pesce luccioperca, sono state calcolate le quantità massime commestibili al giorno (in grammi) per una persona di 70 kg di peso, riportate nella Tabella 8. Questo valore è stato determinato sulla base dei dati di tutte le località di campionamento. Tale valore è stato calcolato utilizzando le concentrazioni medie dei singoli PFAS (PFOS, PFNA, PFHxS e PFOA) e della loro somma; una persona di 70 kg non dovrebbe consumare circa 2 g di pesce al giorno senza un potenziale rischio per la salute nelle località di Bovenschelde, Kanaal Gent-Oostende e Nete. In uno scenario peggiore, utilizzando le concentrazioni massime rilevate nelle specie, ha dimostrato che gli esseri umani provenienti dalla zona di Kanaal Gent-Terneuzen non dovrebbero consumare più di 0,001 g al giorno. Per i risultati di cui sopra sono stati utilizzati gli LMR del gruppo di esperti scientifici dell'EFSA sui contaminanti nella catena alimentare (European Food Safety Authority, 2020), in quanto sono i più severi. Per i calcoli basati sugli LMR dell'ATSDR (Agency for Toxic Substances, Disease Registry, 2019) per PFOS, PFNA, PFHxS e PFOA, si rimanda alla Tabella 8.

Tabella 8: Livelli minimi di rischio (LMR) e quantità massime commestibili (g/giorno) di tessuto muscolare di pesce, che una persona di 70 kg può consumare al giorno senza rischi per la salute (valori Q), determinati per le concentrazioni medie nelle Fiandre.

	ATSDR				EFSA
	PFOA	PFNA	PFHxS	PFOS	SUM PFOA, PFOS, PFHxS, PFNA
LMR (ng/kg/giorno)	3	3	20	2	0,63
Quantità massima commestibile al giorno (g) per una persona di 70 kg (valore Q)					
Bovenshelde	4508,83	7366,96	33037,75	15,85	2,46
Zeeshelde	4805,36	3075,22	4126,74	9,55	0,16
Kanaal-Gent-Oostende	5525,50	989,76	13296,64	14,99	2,27
Nete	13511,15	7064,56	17675,78	19,38	2,00
Dijle	22939,34	5074,31	16520,41	21,09	1,63
Leopoldkanaal	10444,18	687,61	27403,97	19,45	1,94
Rupel	8782,43	3548,17	9359,31	12,15	0,62
Kanaal Brussel-Charleroi	9511,48	4650,50	10384,69	10,85	0,81
Polder Van Lier	31942,65	6486,75	57893,84	6,86	0,54
Ijzer	12000,00	1618,78	47664,78	18,25	1,41
Havendok	2970,21	6606,45	4487,25	12,63	1,28
Albertkanaal	29767,18	3197,74	46168,28	22,05	1,71
Kanaal Roeselare-Leie	84000,00	4027,62	21374,05	16,07	1,00
Kanaal Kortrijk-Bossuit	84000,00	6431,85	28484,23	9,61	1,50
Kanaal Gent-Terneuzen	84,00	1,73	4,17	0,01	0,0013

3.2.3.3. *Analisi Statistica*

Sono state osservate differenze significative a un livello di $p < 0,05$ per tutte le variabili, eccetto la PFUDA per i PFAS rilevati a concentrazioni superiori al 50%, come mostrato nella Tabella 9.

I dati sono stati testati per verificare l'idoneità all'analisi fattoriale. La misura di adeguatezza del campionamento di Kaiser-Meyer-Olkin ha dato un valore di 0,624 (maggiore di 0,500). Il test di sfericità di Bartlett ha prodotto un valore approssimativo del chi-quadro di 314,196 (con un livello di significatività inferiore a 0,0001). Le correlazioni positive più elevate sono state osservate per PFHpS - PFHxS (0,856), PFOS - PFHxS (0,694), PFTeDA - PFTrDA (0,493) e PFDS - PFTrDA (0,489), mentre le due correlazioni negative più elevate sono state osservate per PFTrDA - PFDA (-0,388) e PFTeDA - PFDA (-0,300).

Secondo il criterio di Kaiser, sono state estratte tre componenti principali con autovalori superiori a uno (rispettivamente 3,113, 2,352 e 1,739) che spiegano il 31,132%, il 23,516% e il 17,384% della varianza totale. La prima componente mostra la più alta correlazione positiva con PFTrDA (0,785), PFUDA (0,688), PFDoA (0,687), PFOS (0,663) e PFDS (0,552); PFHxS (-0,749) e PFHpS (0,675) hanno una correlazione negativa con la seconda componente. Le variabili dominanti nella terza componente sono PFNA (0,752), PFDA (0,701) e PFTeDA (-0,507).

I diagrammi di carico e di punteggio per la PCA sono riportati nella Figura 13. Dal grafico dei punteggi si può notare che i gruppi di campioni si sovrappongono tra loro.

Tabella 9: Concentrazioni di PFSA (pg/g, media $\pm$ deviazione standard) e risultati del test di Kruskal-Wallis per i campioni di diverse regioni.

Region	PFNA	PFDA	PFUDA	PFDoA	PFTriDA	PFTeDA	PFHxS	PFHpS	PFOS	PFDS
<i>Zeeschelde</i> (n=18)	68,29 $\pm$ 36,13 (A)	649,11 $\pm$ 262,05 (A)	581,69 $\pm$ 225,8 9	951,60 $\pm$ 558,71 (C)	434,12 $\pm$ 198,34 (CD)	319,56 $\pm$ 256,1 2 (B)	339,25 $\pm$ 284,5 4 (D)	127,37 $\pm$ 140,7 8 (B)	14655,74 $\pm$ 6836,2 7 (B)	51,96 $\pm$ 44,5 5 (B)
<i>Nete</i> (n=3)	29,39 $\pm$ 47,45 (A)	895,14 $\pm$ 698,13 (A)	362,35 $\pm$ 144,9 3	720,74 $\pm$ 345,14 (C)	218,58 $\pm$ 225,06 (B)	n.d. (A)	79,19 $\pm$ 50,42 (B)	34,64 $\pm$ 18,60 (A)	7225,18 $\pm$ 2194,47 (A)	n.d. (A)
<i>Dijle</i> (n=3)	48,04 $\pm$ 17,46 (A)	610,63 $\pm$ 77,55 (A)	351,24 $\pm$ 37,32 (C)	964,44 $\pm$ 277,47 (C)	166,68 $\pm$ 141,88 (B)	928,84 $\pm$ 877,7 3 (C)	102,36 $\pm$ 16,58 (C)	41,96 $\pm$ 10,61 (A)	7184,79 $\pm$ 921,78 (A)	12,17 $\pm$ 17,6 1 (A)
<i>Leopoldkanaal</i> (n=3)	305,39 $\pm$ 164,8 3 (C)	1929,38 $\pm$ 1470,5 4 (B)	620,94 $\pm$ 312,9 3	321,56 $\pm$ 248,43 (A)	n.d. (A)	n.d. (A)	51,07 $\pm$ 26,04 (AB)	42,09 $\pm$ 6,44 (A)	7196,62 $\pm$ 1519,26 (A)	n.d. (A)
<i>Rupel</i> (n=6)	59,19 $\pm$ 20,18 (A)	625,08 $\pm$ 79,60 (A)	442,47 $\pm$ 130,1 9	982,48 $\pm$ 469,31 (C)	529,99 $\pm$ 120,68 (D)	822,57 $\pm$ 520,9 5 (C)	149,58 $\pm$ 70,53 (C)	63,96 $\pm$ 22,83 (A)	11523,12 $\pm$ 1301,4 6 (B)	69,07 $\pm$ 27,1 7 (B)
<i>Kanaal</i> <i>Brussel</i> <i>Charleroi</i> (n=7)	46,16 $\pm$ 27,54 (A)	538,11 $\pm$ 246,48 (A)	429,25 $\pm$ 196,2 0	967,38 $\pm$ 432,39 (C)	467,29 $\pm$ 317,71(CD)	616,83 $\pm$ 467,8 4 (BC)	134,81 $\pm$ 114,1 6 (C)	48,44 $\pm$ 38,17 (A)	12899,41 $\pm$ 7982,3 1 (B)	90,73 $\pm$ 54,3 0 (C)
<i>Polder Van</i> <i>Lier</i> (n=4)	32,38 $\pm$ 12,22 (A)	1455,21 $\pm$ 671,92 (B)	573,83149,88 $\pm$	614,95 $\pm$ 128,16 (C)	115,26 $\pm$ 58,30 (B)	40,84 $\pm$ 45,69 (A)	24,19 $\pm$ 3,21 (A)	33,14 $\pm$ 5,77 (A)	20421,94 $\pm$ 3064,4 7 (C)	67,17 $\pm$ 33,3 1 (B)
<i>Ijzer</i> (n=4)	129,73 $\pm$ 40,06 (B)	1486,10 $\pm$ 372,26 (B)	571,97 $\pm$ 238,3 1	641,75 $\pm$ 354,45 (C)	154,93 $\pm$ 56,63 (B)	168,91 $\pm$ 130,9 1 (AB)	29,37 $\pm$ 0,98 (A)	28,12 $\pm$ 6,93 (A)	7672,12 $\pm$ 3449,91 (A)	53,27 $\pm$ 48,5 7 (B)
<i>Havendok</i> (n=3)	31,79 $\pm$ 7,91 (A)	381,51 $\pm$ 65,26 (A)	374,88 $\pm$ 52,18 (C)	696,35 $\pm$ 170,08 (C)	388,29 $\pm$ 117,32 (C)	352,62 $\pm$ 277,8 4 (B)	311,99 $\pm$ 34,68 (D)	67,30 $\pm$ 13,17 (A)	11082,66 $\pm$ 1829,2 9 (B)	59,79 $\pm$ 19,3 7 (B)
<i>Albertkanaal</i> (n=4)	65,67 $\pm$ 33,21 (A)	630,25 $\pm$ 294,90 (A)	417,47 $\pm$ 81,72 (D)	896,87 $\pm$ 170,48 (D)	387,87 $\pm$ 77,24 (C)	683,48 $\pm$ 63,82 (BC)	30,33 $\pm$ 4,49 (A)	30,40 $\pm$ 20,17 (A)	6348,46 $\pm$ 3708,71 (A)	54,75 $\pm$ 17,0 3 (B)
<i>Kanaal</i> <i>Roeselare-Leie</i> (n=5)	52,04 $\pm$ 34,62 (A)	1490,18 $\pm$ 676,25 (B)	911,30 $\pm$ 355,6 5	2037,24 $\pm$ 692,8 4 (E)	1058,00 $\pm$ 327,05 (E)	764,56 $\pm$ 291,3 8 (BC)	65,50 $\pm$ 37,50 (B)	19,40 $\pm$ 10,19 (A)	8709,62 $\pm$ 2867,27 (A)	41,56 $\pm$ 7,63 (B)
H statistic	23,777	26,249	16,049	22,134	36,220	29,773	43,591	38,235	30,104	22,051
Asymp, Signif.	0,008	0,003	0,098	0,014	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,015

Lettere diverse nella stessa riga rappresentano risultati statisticamente diversi ($p < 0.05$ in grassetto).

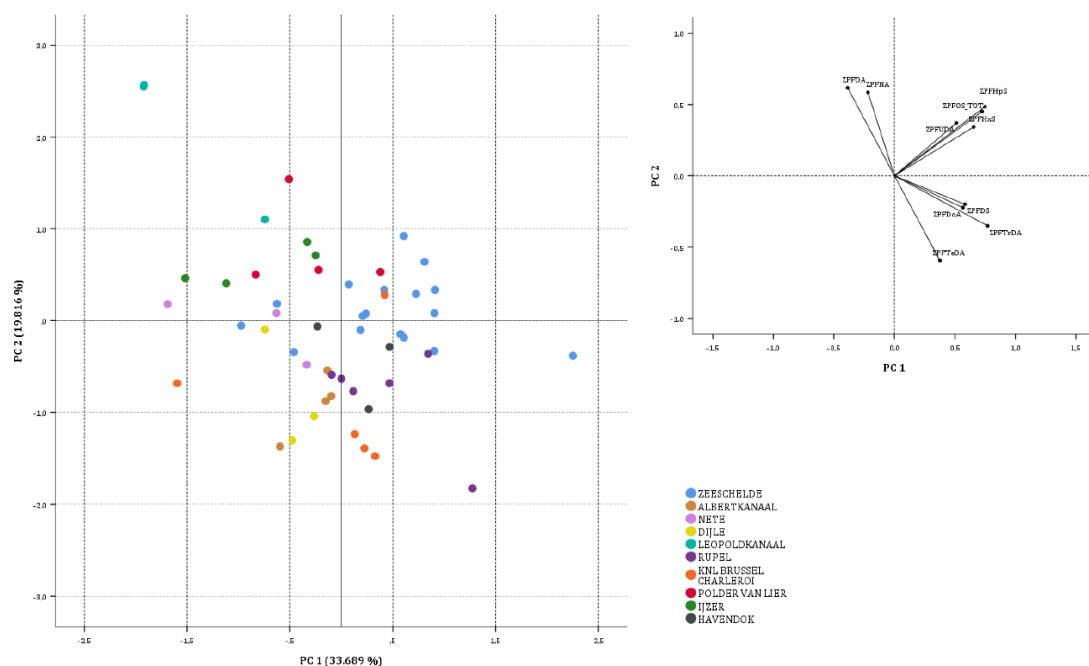


Figura 13: Grafico dei punteggi per PC1 e PC2 suddivisi per gruppi di campioni. Insetto: grafico dei carichi per PC1 e PC2.

3.2.4. Discussioni

A causa dell'elevata produzione e delle numerose applicazioni, i PFAS sono stati rilevati in un'ampia varietà di specie acquatiche, sia di acqua dolce (Piva et al., 2022; Hoa et al., 2022) che di acqua salata (Lee et al., 2022; Khan et al., 2023), non solo in Belgio (Jeong et al., 2022), ma anche in Europa (Fredriksson et al., 2022; Valsecchi et al., 2021; Åkerblom et al., 2017) e nel resto del mondo (Joerss & Menger, 2023; Abunada et al., 2020). Data la crescente diffusione e rilevanza di questi composti, è diventato fondamentale mantenere un monitoraggio costante dei loro livelli. Questo è fondamentale per salvaguardare la salute umana e animale e per migliorare le normative esistenti e future.

I risultati di questo studio indicano che la presenza di PFAS nell'ambiente acquatico del Belgio rimane significativa. Sono stati analizzati in totale 24 composti, 13 dei quali erano presenti in più del 50% dei campioni di *Sander lucioperca*. In particolare, tre di essi (PFHxS, PFHpS e PFOS) erano presenti in tutti i campioni, seguiti da PFDA, PFUDA e PFDoA, PFNA e PFTTrDA con percentuali comprese tra il 98% e il 93%, e da PFTeDA e PFDS con percentuali superiori al 70%. PFNS e PFDoS sono stati rilevati in oltre il 64% dei campioni, mentre il PFOA è presente nel 54% dei campioni. I restanti composti (PFUDS, PFTTrDS, HFPO-DA, PFBA, PFHpA, PFBS, PFPeA, PFHxA, PFPeS, F53B minore, F53B maggiore, DONA) erano al di sotto della soglia di rilevamento del 50%. Il contributo combinato dei quattro PFAS attualmente soggetti a regolamentazione europea (PFOA, PFNA, PFHxS e PFOS) è risultato in media pari al 75%.

Le aree selezionate per il campionamento coprono una vasta regione del Belgio, nota come Fiandre. L'area di interesse è caratterizzata da un'alta densità di popolazione, con una superficie di oltre 13.000 km² e una popolazione di oltre 6.000.000 di abitanti. Diversi fattori possono contribuire alla presenza di PFAS nell'ambiente, tra cui le pratiche agricole, l'edilizia residenziale, i processi industriali e altri ancora.

Nel 2020, il consumo apparente di pesce e prodotti ittici in Belgio è stato stimato in 22,97 kg pro capite. I consumatori abituali, ovvero coloro che mangiano pesce almeno una volta al mese, sono principalmente nelle fasce d'età 40-54 e 55+. I consumatori abituali

rappresentano il 69% del totale e consumano principalmente prodotti freschi e congelati; il consumo di pesce sfuso è meno comune (54%) (EUMOFA, 2023).

Lo studio condotto da Byns et al., (2022) ha esaminato le concentrazioni di PFOS in diverse specie ittiche, tra cui *P. platessa*, *S. solea*, *M. surmuletus*, *A. laterna*, *C. harengus*, *M. merlangus* e *G. vulgaris*. Nel Mare del Nord belga, il PFOS è risultato essere il contaminante più diffuso, contribuendo tra il 60% e il 13% della concentrazione totale, con una media di 3,03 ng/g in *P. platessa* e 0,29 ng/g in *G. vulgaris*. Nel lavoro di Teunen et al., (2021), la regione delle Fiandre è stata esaminata analizzando anguilla, pesce persico e cozze. Si può notare che il PFOS era il composto più presente nel pesce persico e nell'anguilla, con concentrazioni che andavano da meno di LOQ a 0.7 ng/g, mentre non era presente nei mitili, dove era più presente il PFOA. Hoff et al., (2005) hanno condotto una valutazione dei PFOS nella carpa comune (*Carassius auratus gibelio*), nella carpa (*Cyprinus carpio*) e nell'anguilla (*Anguilla anguilla*) nelle Fiandre (Belgio). Le concentrazioni epatiche di PFOS nei pesci del canale leperlee (Boezinge, 250-9031 ng/g w/w) e dello stagno Blokkersdijk (Antwerp, 633-1822 ng/g w/w) erano più elevate rispetto al bacino Zuun (Sint-Pieters-Leeuw, 11,2-162 ng/g w/w). Le anguille dello stagno Oude Maas (Dilsen-Stokkem) e del bacino Watersportbaan (Ghent) presentavano concentrazioni di PFOS comprese tra 212 e 857 ng/g w/w. Nei nostri campioni di lucioperca, la concentrazione di PFOS è risultata significativamente più alta rispetto ai lavori precedenti ($p < 0,05$), con valori compresi tra 2,9 ng/g nel Kanaal Brussel-Charleroi e 37,2 ng/g riscontrati nello Zeeschelde, situato nella regione centro-settentrionale delle Fiandre. Inoltre, nel nostro studio, il PFOA è stato rilevato nel 54% dei campioni analizzati, con una significatività di $p < 0,05$ tra i siti analizzati. La concentrazione di PFOA variava da un valore medio di inferiore al limite di rilevabilità (LOQ) nel canale Albert, nella zona della Polder Van Lier, nella Dijle e un valore medio di 0,07 ng/g nell'Havendok, siti di campionamento geograficamente vicini. La concentrazione più alta di PFOA è stata rilevata a Ijzer, nella parte occidentale delle Fiandre, con un valore di 0,12 ng/g. I campioni analizzati hanno rivelato la presenza non solo di PFOS, ma anche di PFHxS ($p < 0,05$), PFHpS ($p > 0,05$) e PFDoA ($p < 0,05$). Le concentrazioni medie di questi composti erano rispettivamente pari a 0,16, 0,07 e 0,91 ng/g. PFHxS e PFHPS sono due dei polifluoroalchil

solfonati a catena lunga (PFAS), mentre PFDoA è un membro dei carbossilati a catena lunga con 12 carboni. L'analisi statistica ha mostrato una tendenza simile al raggruppamento, osservabile per Ijzer, Leopoldkanaal e Poder Van Lier, caratterizzati dai valori più elevati di PFDA e PFNA (rispettivamente 10C e 9C). Per Kanaal Brussels Charleroi e Rupel, caratterizzati dai valori più elevati di carbonili a catena molto lunga (carbonio >12) PFTeDA, PFDS, PFDoA e PFTrDA; per Albertkanaal e Dijle, caratterizzati dai valori più bassi di PFHpS, PFOS, PFHxS (solfonati a catena lunga) e PFUDA (11C). I risultati ottenuti negli anni in Belgio mostrano che i livelli di PFAS sono generalmente inferiori rispetto agli anni Duemila.

Un totale di 13 acidi perfluoroalchilici (PFAA) è stato analizzato in pesci provenienti da laghi finlandesi e dal Mar Baltico. Le specie analizzate includevano il lucioperca e altre 12 specie ittiche (Kumar et al., 2022). Un'indagine sui campioni di pesce ha permesso di rilevare la presenza di PFOS nel 97% degli esemplari. PFNA, PFDA e PFUnDA sono stati identificati rispettivamente nel 67%, 54% e 61% dei campioni analizzati. In particolare, il PFOA è stato osservato solo nei campioni di aringa e osmeride del Mar Baltico. Questi dati sono inferiori a quelli ottenuti nel nostro studio, in cui il PFOS era presente in tutti i campioni, il PFNA nel 96%, il PFDA e il PFUnDA nel 98%, il PFHxA e il PFHpA in tracce, in modo simile alla Finlandia, mentre il PFTeDA, il PFHpS e il PFDS erano presenti rispettivamente nel 76%, nel 100% e nel 74% dei nostri campioni. Al contrario, altri PFAA, tra cui PFHxA, PFHpA, PFTeDA, PFHpS e PFDS, non sono stati rilevati in nessuno dei campioni analizzati.

Le informazioni sul consumo di pesce in Belgio, inclusi i dettagli sull'origine del consumo di pesce e crostacei, sono molto limitate. Nel presente studio, per tutti i calcoli è stato utilizzato un peso corporeo di 70 kg. Secondo l'EUMOFA, il consumo apparente è stato stimato in 21,79 kg pro capite nel 2021. Le specie più consumate sono il salmone, il merluzzo, i crostacei e il tonnetto striato (EUMOFA, 2021). Gli acidi grassi (FA) presenti nel pesce sono ampiamente riconosciuti come beneficiari per la salute umana. In particolare, i grassi del pesce sono costituiti principalmente da esteri di acidi grassi insaturi e sono particolarmente ricchi di acidi grassi polinsaturi a catena lunga n-3, tra cui l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA). Questi acidi grassi

essenziali sono fondamentali per l'alimentazione umana e contribuiscono alla prevenzione delle malattie e alla promozione della salute generale. Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) a lunga catena ω -3 non possono essere sintetizzati dall'uomo e devono essere assunti attraverso la dieta. Inoltre, è dimostrato che i PUFA ω -3 sono fondamentali per lo sviluppo e il funzionamento del sistema nervoso, della fotorecezione e del sistema riproduttivo (Çelik et al., 2015; Conner, 1997; Leaf & Weber, 1988).

Una sfida riscontrata nell'analisi dei dati sul rischio umano ottenuti da varie fonti è l'assenza di un approccio coerente al tipo di calcolo impiegato. È possibile fare riferimento alla metodologia TWI, o ai livelli minimi di rischio (LMR), come mostrato in studi precedenti. Si possono prendere in considerazione i dati presentati da Cara et al. (2022) e Teunen et al., (2021), così come i dati dell'assunzione giornaliera stimata (EDI) di Barhoumi et al., (2022) e Chiesa et al., (2022). Reinikainen et al., (2024) hanno evidenziato l'incoerenza da parte dell'Unione Europea nell'adozione di diverse misure normative per la loro gestione. Nel loro studio, è stato riscontrato anche il livello massimo di contaminanti (ML) nei pesci di cat. 3 (pesce persico): 35 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo per i PFOS, 8 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo per PFOA e PFNA, 1.5 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo per PFHxS e 45 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo per la loro somma. La dose settimanale tollerabile (TWI) è una stima della quantità di una sostanza aggiunta non intenzionalmente negli alimenti o nell'acqua potabile che può essere consumata senza rischi per la salute nel corso della vita. Nel 2020, il gruppo di esperti scientifici dell'EFSA sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM) ha rivalutato i suoi precedenti pareri scientifici (EFSA, 2008; 2018) e ha stabilito una nuova TWI di 4,4 ng/kg bw a settimana per la somma di PFOA, PFOS, PFNA e PFHxS (EFSA, 2020).

I dati ottenuti da questo studio mostrano che in generale tenendo conto del valore di LMR ottenuto sulla somma dei 4 PFAS regolamentati, si nota come in media nella maggior parte dei siti di campionamento si possa consumare circa 1,5 g di pesce giornalmente (minimo 0,001 g; massimo 2,46 g). Confrontando i dati ottenuti con quelli dello studio di Teunen et al., (2021), si nota come la quantità massima commestibile di pesce persico al giorno sia nettamente maggiore (media 5 g, minimo 0,82 g e massimo 15 g) rispetto a quelli rilevati dal nostro studio. Indicando come nel corso degli anni i livelli di PFAS

nell'area delle Fiandre sia aumentata. Uno studio condotto da Barhoumi et al. (2022) indica che le concentrazioni di PFAS presenti in pesci, crostacei e molluschi della laguna di Bizerte (Tunisia) non dovrebbero causare danni immediati ai consumatori locali. Tuttavia, uno studio del (2019) di Taylor et al., ha anche rilevato che i metodi di cottura più comuni per il pesce, come la bollitura e la frittura, non riducono le concentrazioni di PFAS, ma piuttosto che l'aumento dei PFAS è dovuto alla perdita di massa durante la cottura e, quindi, non riduce l'esposizione alimentare (Taylor et al., 2019). È importante notare che la carne di pesce non è l'unica fonte di esposizione orale alle sostanze perfluoroalchiliche (PFAS). Come dichiarato dall'EFSA, anche il consumo di frutta, uova e prodotti a base di uova e l'acqua potabile contribuiscono all'assunzione totale di questi composti pericolosi (EFSA, 2020). Nelle Fiandre, il consumo elevato di questa specie è dovuto alla alta percentuale di catture derivante dall'attività di pesca sportiva, pertanto le famiglie potrebbero essere esposte a pesce contaminato. Le quantità massime raccomandate di pesce che potrebbero essere consumate senza comportare rischi per la salute (valori Q; Tabella 9), calcolate utilizzando le concentrazioni medie nelle specie ittiche, sono risultate superiori alle quantità medie di consumo nelle Fiandre per entrambe le specie, utilizzando il LMR dell'ATSDR (Agency for Toxic Substances, Disease Registry, 2019). Pertanto, è probabile che i pescatori ricreativi locali abbiano una maggiore probabilità di subire gli effetti dannosi delle concentrazioni di PFAS accumulate. L'accumulo di PFOS nell'uomo è stato associato a molteplici effetti epatotossici, neurotossici, riproduttivi, immunotossici e di disturbo della tiroide, che potrebbero causare gravi malattie e persino la morte (come riportato da Zeng et al., 2019). Anche a concentrazioni molto basse, i PFAS possono alterare il metabolismo dei lipidi, alterando la regolazione del peso corporeo (Gorochategui et al., 2014). Il governo fiammingo sconsiglia tuttavia già il consumo di pesci predatori provenienti dai corpi idrici fiamminghi a causa delle elevate concentrazioni di altri inquinanti, ad esempio, i PCB (Maes et al., 2008).

3.2.5. Conclusioni

Lo studio ha dimostrato che la prevalenza di PFAS nei pesci d'acqua dolce nelle Fiandre rimane significativa, evidenziando un problema ambientale e sanitario di rilievo. Lo studio mirava inoltre a valutare il rischio associato al consumo di pesce contaminato da PFAS. È importante sottolineare il rischio potenziale che possono correre i pescatori locali, che lo utilizzano direttamente o lo rivendono localmente.

A tal proposito, è cruciale che vengano intraprese azioni mirate per sensibilizzare e informare le comunità locali sui potenziali rischi legati al consumo di pesce contaminato. La collaborazione tra enti di ricerca, autorità sanitarie e organizzazioni di pesca sarà fondamentale per sviluppare linee guida e politiche di gestione efficaci.

Saranno necessari ulteriori studi per ampliare le specie ittiche esaminate e includere l'acqua e altre fonti alimentari al fine di continuare a monitorare quest'area dell'Europa. Tali studi dovranno anche investigare le fonti di contaminazione da PFAS e i loro percorsi di bioaccumulo nei diversi comparti ambientali e nelle catene alimentari.

Inoltre, l'adozione di tecnologie avanzate per il monitoraggio e il trattamento dei PFAS nelle acque potrebbe rappresentare una strategia chiave per ridurre l'esposizione umana a questi contaminanti. La ricerca futura dovrebbe concentrarsi anche sullo sviluppo di metodi innovativi e sostenibili per la bonifica ambientale e la prevenzione della diffusione dei PFAS.

3.3. Valutazione *in vitro* delle alterazioni cellulari e fisiologiche di *Mytilus galloprovincialis* esposte al benzisotiazolinone (BIT)

3.3.1. Premesse

Il benzisotiazolinone (BIT, CAS n. 2634-33-5) è un biocida a base di isotiazolinone, e ampiamente utilizzato, noto soprattutto per le sue proprietà antimicrobiche e impiegato in vari prodotti industriali e domestici a base acquosa, come pitture, vernici, smalti, coloranti per la stampa, miscele, detergenti, guanti monouso e come conservante nei pesticidi (Schwensen & Johansen, 2020; Rafoth et al., 2007; Flyvholm, 1991; Uter et al., 2019). Questa classe di biocidi, a base isotiazolinona, esercita la loro azione contro diversi funghi e batteri grazie alla presenza di un gruppo a base di zolfo, capace di ossidare i gruppi funzionali tiolici per formare disolfuri, come avviene ad esempio con la cisteina e il glutatone, osservando un effetto di inibizione della crescita su *E. coli* e *Schizosaccharomyces pombe* (Collier et al., 1990; Morris et al., 1984).

Oltre a inibire i composti indesiderati attraverso la reazione con le proteine intracellulari contenenti zolfo, gli isotiazolinoni dimostrano un effetto letale sugli organismi viventi. Ad esempio, la concentrazione letale media (LC50) del BIT per gli embrioni di pesce zebra è di 1,03 mg/L (Li et al., 2016). Lo studio di Lee et al., (2023) ha dimostrato che la BIT ha il potenziale di agire come interferente endocrino della ghiandola tiroidea a concentrazioni fino a 3 µg/L. Il BIT induce quindi ipotiroidismo, alterando i livelli di trascrizione genica durante il periodo embrionale/larvale dei pesci zebra. La conseguente bassa produzione di ormoni tiroidei può influire negativamente sullo sviluppo, la crescita e le caratteristiche sessuali secondarie dei pesci (Dang et al., 2021).

La sua efficacia nell'inibire la crescita microbica lo ha reso un conservante di base in molte formulazioni; tuttavia, il suo utilizzo ha sollevato notevoli preoccupazioni a causa del suo potenziale di provocare allergie da contatto, la sua persistenza ambientale e tossicità (Schwensen & Johansen, 2020; Flyvholm, 1991; Silva et al., 2020; Collier et al., 1990). Inoltre, grazie alla sua capacità biocida, il BIT è stato ampiamente utilizzato nelle formulazioni di disinfettanti durante la pandemia da COVID-19. Il Comitato Scientifico per la Sicurezza dei Consumatori (SCCS) ha ritenuto il BIT non sicuro per l'uso come

conservante nei prodotti cosmetici nell'UE e in Svizzera, anche se continua a essere utilizzata in altri stati, come Australia, Stati Uniti e Canada (SCCS, 2013). Il BIT, così come altri biocidi quali l'octilisotiazolinone (OIT), il metilcloroisotiazolinone (CMI) e il metilisotiazolinone (MI), sono classificati come sensibilizzanti cutanei nella classificazione armonizzata secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 della Commissione Europea (Regolamento CE della Commissione Europea, 2008) e sono noti per causare dermatiti allergiche da contatto (DAC; Aerts et al., 2016; Mose et al., 2013). Ciò è dovuto al fatto che gli isotiazolinoni hanno un basso peso molecolare che consente loro di penetrare facilmente nell'epidermide e di reagire con le macromolecole cutanee. Gli studi ambientali hanno dimostrato la stabilità del BIT, rivelandone la presenza nelle acque di superficie e nei concentrati per il trattamento delle acque reflue, il che indica la sua resistenza alla degradazione, visto che presenta una emivita in ambiente acquatico di oltre 30 giorni (Rafoth et al., 2007; Bollmann et al., 2017; United States Environmental Protection Agency, 2005). A causa delle preoccupazioni ambientali, le vernici a base d'acqua hanno recentemente sostituito quelle a base di solventi, che richiedono l'aggiunta di biocidi come gli isotiazolinoni o il BIT (Silva et al., 2020). Tuttavia, il BIT sembra essere potenzialmente tossico per gli organismi acquatici, ed è già stato dimostrato che può causare danni agli occhi e irritazioni cutanee nell'uomo (ECHA, 2019). È essenziale viste queste premesse, monitorare le concentrazioni di BIT nelle acque reflue per mitigare la sua impronta ambientale, in quanto può presentare rischi non solo per la salute umana, ma anche per gli ecosistemi acquatici (Rafoth et al., 2007; Li et al., 2016).

Il mitilo mediterraneo, *Mytilus galloprovincialis*, è un eccellente organismo modello per gli studi ecotossicologici, grazie alla sua ampia distribuzione, alle abitudini di filtraggio e alla sensibilità ai contaminanti ambientali (Impellitteri et al., 2024a,b). La cozza è spesso utilizzata nei programmi di biomonitoraggio per valutare l'impatto degli inquinanti sugli ecosistemi marini, il che la rende una specie preziosa per studiare gli effetti fisiologici e cellulari di sostanze tossiche come il BIT (Widdows & Donkin, 1992). In questo studio ci si è concentrati sul potenziale impatto fisiologico e cellulare del BIT su *Mytilus galloprovincialis*. Condotta in vitro, questa ricerca mira a chiarire gli effetti

dell'esposizione alla BIT sui processi biologici chiave di questo organismo modello. Comprendendo le risposte specifiche del *Mytilus galloprovincialis* al BIT, possiamo comprendere le implicazioni più ampie della contaminazione da BIT negli ambienti marini e contribuire allo sviluppo di politiche normative più efficaci per proteggere la vita acquatica e la salute umana.

L'attività di ricerca è stata sottoposta ad un comitato di revisione per la pubblicazione di un articolo su rivista indicizzata del quale si riportano le informazioni fondamentali, figure e tabelle.

3.3.1.1. Regolamentazione sui conservanti e antimicrobici

I conservanti e gli antimicrobici sono sostanze ampiamente usate nella preparazione di cosmetici prodotti domestici e industriali per prevenire la crescita microbica e il deterioramento dei prodotti.

Secondo il regolamento europeo 1223/2009, regolamento vigente in materia di cosmetici, i conservanti sono “sostanze destinate esclusivamente o prevalentemente ad inibire lo sviluppo di microorganismi nel prodotto cosmetico” e sono tutti elencati nell'allegato V, e non possono essere usati composti che non sono presenti in questo elenco. Inoltre, all'interno del regolamento vi è una sezione che elenca tutti i nanomateriali che possono essere utilizzate come conservanti.

Il BIT è registrato all'interno del Regolamento REACH indicandola come letale se inalata, molto tossica per la vita acquatica con effetti di lunga durata, nociva se ingerita, provoca gravi danni agli occhi, provoca irritazione cutanea e può causare una reazione allergica cutanea (SCCS, 2013; Novick et al., 2013; Aalto-Korte et al., 2007). Pur non avendo dati registrati sulle vie di rilascio nell'ambiente, l'ECHA indica che può avvenire dall'uso nelle industrie durante la formulazione di miscele e formulazione in materiali: prodotti fitosanitari, cosmetici e prodotti per la cura della persona, biocidi (disinfettanti, prodotti per il controllo dei parassiti), fertilizzanti e prodotti chimici di laboratorio.

3.3.1.2. I conservanti e gli antimicrobici nei prodotti per la cura della persona

Come premesso i conservanti e gli antimicrobici sono sostanze aggiunte con il fine esclusivo o principale di inibire lo sviluppo di microorganismi nei prodotti cosmetici e della cura della persona. La loro presenza è spesso fondamentale per garantire la sicurezza microbiologica e proteggere il prodotto da microorganismi, quali batteri, funghi, lieviti e muffe. Infatti, molto spesso i cosmetici e in generale i prodotti per la cura della persona sono il terreno ideale alla crescita di questi microorganismi, in quanto contengono alte percentuali di acqua, nutrienti e sostanze che promuovono la crescita, come lipidi, polisaccaridi, proteine, amminoacidi, peptidi e vitamine.

La contaminazione da parte di agenti esterni può avvenire in diverse maniere:

- Le materie prime: in particolare quelle di origine naturale, possono essere già di loro contaminate e veicolare così i patogeni.
- Durante il processo produttivo: è possibile l'ingresso dei microorganismi nel prodotto, nelle materie prime o nelle pre-miscele. Per questo ogni impianto di produzione si deve attenere alle GMP (Good Manufactory Practice) che regolamentano le strategie di igiene e sicurezza in tutte le fasi di produzione.
- Dopo l'apertura da parte del consumatore: qui le fonti di contaminazione possono essere varie, dal prelievo del prodotto con le mani o strumenti (spugne, pennelli, spatole) non ben pulite, la conservazione senza prestare attenzione alle linee guida del prodotto (metterli in luoghi umidi o a contatto con acqua, non ben chiusi ed esposti all'aria).

In generale tutti i prodotti hanno bisogno di un sistema di conservazione, ma non sempre questo vuol dire usare conservanti. È fondamentale che tutti i prodotti dispongano di un sistema che impedisca lo sviluppo di batteri. Questo obiettivo può essere raggiunto attraverso l'uso di conservanti e antimicrobici, oppure tramite l'implementazione di strategie alternative. Negli ultimi tempi, continuando la moda dell'impiego di meno ingredienti possibili, le aziende hanno iniziato a produrre cosmetici e in generale prodotti per la cura della persona senza conservanti. Ma come è possibile ciò? Si è lavorato sull'uso di strategie alternative, quali:

- Lavorare secondo le GMP in tutte le fasi di produzione.
- Utilizzo di packaging che riducono il contatto con l'ambiente esterno.
- Ridurre la quantità di acqua nella formulazione del prodotto. Formulando come prodotto solido o anidro o usando sali, idrocolloidi e polioili.
- Uso di emulsioni acqua/olio.
- Controllo del pH: in quanto i microorganismi spesso crescono a determinati valori di pH.

Uno studio condotto da Roden, (2010), ha evidenziato come dei prodotti di cura personali che risalivano agli anni '60 e '70 del secolo scorso e rimasti chiusi, risultassero contaminati da vari batteri, tra cui maggiormente *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Burkholderia cepacia* per i prodotti con alto contenuto di surfattanti come shampoo e saponi per mani e corpo, mentre in prodotti che erano formulati con emulsioni acqua/olio (creme ad esempio) risultavano contaminati maggiormente oltre che dai batteri sopracitati, anche da cocci Gram-positivi, come i micrococchi e gli stafilococchi, tra cui lo *Staphylococcus aureus*, e anche spore aerobiche.

Il BIT è presente in vari prodotti, come deodoranti per ambienti, detergenti, smacchiatori, detersivi per bucato e lavastoviglie, prodotti per il lavaggio delle mani e cartucce di inchiostro, può essere assorbita attraverso varie vie di esposizione, tra cui quella orale, cutanea e inalatoria (Aalto-Korte et al., 2007; IMAP, 2023). Lo studio di King et al., 2021, ha evidenziato come vi sia stato un aumento del numero di reazioni allergiche al BIT, dal 2014 al 2019, con un aumento che andava dallo 0.26% del 2014 fino al 3.42% in più nel 2019. Visti gli effetti avversi riscontranti sia in animali da esperimento che nell'uomo, il BIT è stata bandita dai cosmetici nell'UE e in Svizzera. Tuttavia, il BIT viene utilizzato nei cosmetici in Australia, Stati Uniti e Canada (IMAP, 2003; Garcia-Hidalgo et al., 2018).

L'uso dei biocidi nei prodotti domestici è ampiamente diffuso e pertanto essi finiscono per essere rilasciati nelle acque reflue. Nonostante i recenti progressi nei trattamenti convenzionali, gli impianti di trattamento delle acque reflue (WWTP) sembrano essere ancora inadeguati per queste sostanze (Margot et al., 2013; Kahle et al., 2008; Kupper et al., 2006; Stamatis et al., 2010). I biocidi vengono rilasciati nell'ambiente acquatico, portando a concentrazioni che potrebbero avere un impatto dannoso sugli organismi

acquatici (Singer et al., 2010; Wick et al., 2010; Moschet et al., 2015; Wittmer et al., 2010). Tuttavia, queste sostanze sono ancora poco regolamentate e monitorate nelle acque superficiali, nonostante i loro effetti negativi sulla vita acquatica (Mohr et al., 2008; Vermeirssen et al., 2018).

Nello studio di Paijens et al., (2021) è stata evidenziata la presenza di diversi biocidi nelle acque della Senna a Parigi. In particolare, il BIT presentava una concentrazione media di 320 ng/L nel WWTP influente e di 24 ng/L nel WWTP effluente. Quindi, le opere di trattamento delle acque non sono riuscite a eliminare completamente la presenza del BIT. In studi meno recenti sono stati registrati livelli anche più alti di BIT nelle WWTP: lo studio di Rafoth et al., (2007) ha rilevato una concentrazione media di 1.7-3.2 µg/L, mentre lo studio di Wieck et al., (2018) ha rilevato una concentrazione media di 980-1.75 ng/L.

Lo studio che verrà di seguito trattato si è concentrato sul potenziale impatto fisiologico e cellulare del BIT su *Mytilus galloprovincialis*. Questa ricerca, condotta *in vitro*, mira a chiarire gli effetti dell'esposizione al BIT sui processi biologici chiave di questo organismo modello. Comprendendo le risposte specifiche del *Mytilus galloprovincialis* al BIT, si potranno comprendere le implicazioni più ampie della contaminazione da BIT negli ambienti marini e contribuire allo sviluppo di politiche normative più efficaci per proteggere la vita acquatica e la salute umana.

3.3.2. Materiali e Metodi

3.3.2.1. Raccolta e acclimatazione della specie

Un totale di 60 esemplari di *Mytilus galloprovincialis* sono stati ottenuti da un allevamento commerciale situato al Lago Faro, Messina, in Italia, e acquistato presso la società FARAU SRL, Frutti di Mare. Successivamente, i campioni sono stati rapidamente trasportati al Laboratorio di Ecofisiologia Animale dell'Università di Messina, in un box termico contenente acqua di mare. All'arrivo, sono stati acclimatati per sette giorni in tre vasche da 20 L che riproducevano le condizioni del sito naturale (salinità: 3.3 ± 0.05 PSU; temperatura: 17.23 ± 0.10 °C; pH: 7.5 ± 0.03 ; in condizioni di illuminazione naturale). Inoltre, l'acqua filtrata utilizzata per riempire le vasche proveniva direttamente dal bacino in cui sono state raccolte le cozze. Questa fonte naturale di acqua è ricca di alghe e microorganismi, che rappresentano una fonte di nutrimento per i molluschi. Dopo ogni cambio d'acqua, sono stati misurati salinità, pH e temperatura dell'acqua, al fine di mantenerli agli stessi standard iniziali.

3.3.2.2. Raccolta dell'emolinfa e dissezione del muscolo dei mitili

Le analisi sono state effettuate su aliquote di emolinfa e cellule isolate della GD, in triplo. L'emolinfa è stata ottenuta dal muscolo adduttore di sei animali per gruppo sperimentale utilizzando la metodica descritta nel paragrafo 3.1.2.2. Dopo la raccolta dell'emolinfa, gli animali sono stati sacrificati e la ghiandola digestiva è stata prelevata per la successiva valutazione della vitalità cellulare e del meccanismo di regolazione del volume come descritto nel paragrafo soprariportato 3.1.2.7.

3.3.2.3. Esposizione in vitro

Per questo studio sono state utilizzate due concentrazioni di BIT (B1: $0.03 \mu\text{g/L}$; B2: $0.3 \mu\text{g/L}$) per due diversi tempi di esposizione sperimentale (T1: 1 ora e T2: 3 ore). Le concentrazioni utilizzate sono state scelte sulla base di studi bibliografici. In particolare,

la concentrazione più alta (B2: 0.3 µg/L) è stata scelta sulla base dello studio di Paijens et al., (2021), secondo i quali è stato riscontrato un valore di 0.3 µg/L nell'impianto di trattamento delle acque reflue in entrata (WWTP) della Cornubia di Parigi e di 0.024 µg/L nell'impianto di trattamento delle acque reflue in uscita, e di Wick et al., (2010), che hanno rilevato un valore di 0.037 µg/L nelle acque superficiali di un corso d'acqua in Germania. Anche i campioni non trattati (appartenenti al gruppo CTR) sono stati analizzati in parallelo. Tutte le analisi sono state eseguite in triplo nei gruppi trattati con BIT e nel gruppo di controllo. Dopo il prelievo, i campioni di emolinfa sono stati centrifugati a 400 g per 10 minuti a 4 °C e il pellet cellulare è stato aggiunto a una soluzione salina fisiologica. L'emolinfa è stata quindi incubata con B1 e B2 e con il gruppo di controllo non trattato a una temperatura controllata di 18°C per un totale di tre ore, con tempi di campionamento di un'ora e tre ore. Dopo la procedura di isolamento delle cellule della GD, i campioni di cellule sono stati incubati con B1 e B2 per i tempi di esposizione stabiliti. Per l'analisi molecolare, i campioni di ogni condizione sperimentale e tempo di esposizione sono stati raccolti in provette Eppendorf sterili da 1.5 mL e centrifugati a 1000 g per 10 minuti. Il surnatante è stato quindi rimosso e il pellet è stato conservato a -80 °C fino all'estrazione dell'RNA.

3.3.2.4. Valutazione della vitalità degli emociti e delle cellule della ghiandola digestiva

Per le metodiche della valutazione della vitalità di emociti e delle cellule della ghiandola digestiva si rimanda alle descrizioni effettuate nei paragrafi 3.1.2.6. e 3.1.2.7.

3.3.2.5. Analisi della Fagocitosi

Per valutare l'attività fagocitaria delle cellule, i campioni di emolinfa di ciascun gruppo sperimentale sono stati incubati con una soluzione di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*, 1 x 10⁷ lieviti per mL) in provette Eppendorf da 1.5 mL per 30 minuti. La soluzione di lievito è stata aggiunta 30 minuti prima della fine del periodo di incubazione con BIT e sono state eseguite tre repliche per ogni concentrazione e per ogni tempo di esposizione. Aliquote da 10 µL di ciascun campione sono state posizionate su vetrini pre-

rivestiti con poli-L-lisina A, fissate in glutaraldeide all'1% e quindi colorate con una soluzione di Giemsa al 5% per 5 minuti. I vetrini sono stati lavati e montati con Aquovitrex (Carlo Erba). L'attività fagocitaria è stata valutata osservando ogni vetrino al microscopio ottico con un ingrandimento di 400x e selezionando cinque campi microscopici casuali (Carballal et al., 1997). È stata calcolata la percentuale di cellule fagocitarie che inglobano il lievito. Sono stati considerati positivi gli emociti contenenti lievito colorato in blu. La percentuale di cellule positive è stata valutata con il metodo descritto da Carballal et al., (1997), di seguito è riportata la formula:

$$\text{Fagocitosi (\%)} = \frac{\text{numero di emociti con lieviti inglobati}}{\text{totale numero di emociti}} \times 100$$

Secondo Casellas et al., (1991), affinché la fagocitosi possa essere considerata statisticamente valida, è necessario trovare almeno 100 cellule fagocitiche in ogni sezione analizzata. Al termine dell'esperimento, sono state scattate delle immagini con una telecamera (DVC Canada color 1300, 12 bit raffreddati, slow scan) collegata al microscopio.

3.3.2.6. *Analisi Statistica*

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software GraphPad Prism, versione 10.0 (GraphPad Software Inc.). La vitalità delle cellule della GD ed emolinfatichiche, così come l'attività fagocitaria delle cellule emolinfatichiche e il meccanismo di regolazione del volume sono stati espressi come percentuale della media $\pm$ deviazione standard. Un valore di p inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo dopo l'analisi mediante ANOVA a una via e il post hoc Tukey test per i confronti multipli tra gruppi sperimentali. La significatività statistica è stata fissata a $p < 0.05$.

3.3.3. Risultati

3.3.3.1. *Vitalità cellulare*

La vitalità degli emociti e delle cellule della GD è stata valutata dopo l'esposizione alle due concentrazioni di BIT (B1: 0,03 µg/L; B2: 0,3 µg/L) rispettivamente per 1 e 3 ore, utilizzando i metodi di esclusione del TB e di ritenzione del RN.

I risultati presentati nella Tabella 10 mostrano che, nel caso degli emociti, la vitalità si riduce nei gruppi esposti alle due concentrazioni di BIT rispetto al controllo (TB 1h e 3h pari rispettivamente a $98,50\% \pm 1,38$). Nelle cellule esposte a B1, come analizzato dalla TB, si è osservata una riduzione al $97,83\% \pm 1,47$ dopo 1 ora, così come a 3 ore ($97,00\% \pm 1,79$). Al contrario, le cellule esposte a B2 hanno mostrato un lieve aumento della vitalità cellulare, pari al $98,50\% \pm 1,76$ dopo 1 ora, ma una diminuzione significativa del $96,00\% \pm 1,67$ dopo 3 ore ($p < 0,05$). Un andamento simile è stato osservato quando le cellule sono state colorate con NR. Rispetto al controllo, le cellule colorate con NR hanno mostrato un profilo di vitalità simile, con una vitalità del $98,00\% \pm 1,10$ osservata sia a 1 ora che a 3 ore. Tuttavia, è stata osservata una lieve diminuzione alla concentrazione più bassa ($97,33\% \pm 1,51$ e $97,33\% \pm 2,34$ di vitalità rispettivamente a 1h e 3h). D'altra parte, le cellule esposte alla concentrazione più alta (B2) hanno mostrato una marcata diminuzione della vitalità, con una vitalità del $94,33\% \pm 1,47$ osservata a 3h ($p < 0,05$). I risultati presentati nella Tabella 10 mostrano inoltre che, nel caso della GD, si è verificata una riduzione della vitalità nei gruppi esposti alle due concentrazioni di BIT rispetto al controllo (TB a 1h: $99,17\% \pm 0,75$ e a 3h: $99,17\% \pm 0,31$). Nel caso delle cellule trattate con NR, non si è osservata alcuna variazione della vitalità dopo 1 ora ($98,50\% \pm 0,55$) e una riduzione significativa dopo 3 ore ($97,50\% \pm 1,05$; $p < 0,05$), mentre l'opposto è avvenuto per le cellule trattate con BIT. Con la concentrazione più alta di BIT, si è registrato un aumento della vitalità, in particolare dopo 1 ora ($99,67\% \pm 0,52$; $p < 0,05$) e nessun cambiamento dopo la lunga esposizione di 3 ore rispetto al controllo ($99,33\% \pm 0,53$).

Tabella 10: Percentuale della vitalità degli emociti e delle cellule delle ghiandole digestive in *Mytilus galloprovincialis* dopo diversi tempi di esposizione (1h; 3h) alla 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 (RN).

Tipo di cellula	Colorazione	Tempi	Gruppi Testati		
			CTR (0mg/L)	B1 (0.03µg/L)	B2 (0.3µg/L)
Emociti	TB	1h	98,50% ± 1,38 ^a	97,83% ± 1,47 ^a	98,50% ± 1,76 ^a
	RN	1h	98,00% ± 1,10 ^a	97,33% ± 1,51 ^a	98,00% ± 1,10 ^a
	TB	3h	98,50% ± 1,38 ^a	97,00% ± 1,79 ^{a,b}	96,00% ± 1,67 ^b
	RN	3h	98,00% ± 1,10 ^a	97,33% ± 2,34 ^{a,b}	94,33% ± 1,47 ^b
Ghiandola Digestiva	TB	1h	99,17% ± 0,75 ^a	99,00% ± 0,01 ^a	98,67% ± 0,52 ^a
	RN	1h	98,67% ± 0,52 ^a	98,50% ± 0,55 ^a	99,67% ± 0,52 ^b
	TB	3h	99,17% ± 0,31 ^a	97,83% ± 0,17 ^b	99,33% ± 0,21 ^a
	RN	3h	98,67% ± 0,52 ^a	97,50% ± 1,05 ^b	99,33% ± 0,53 ^a

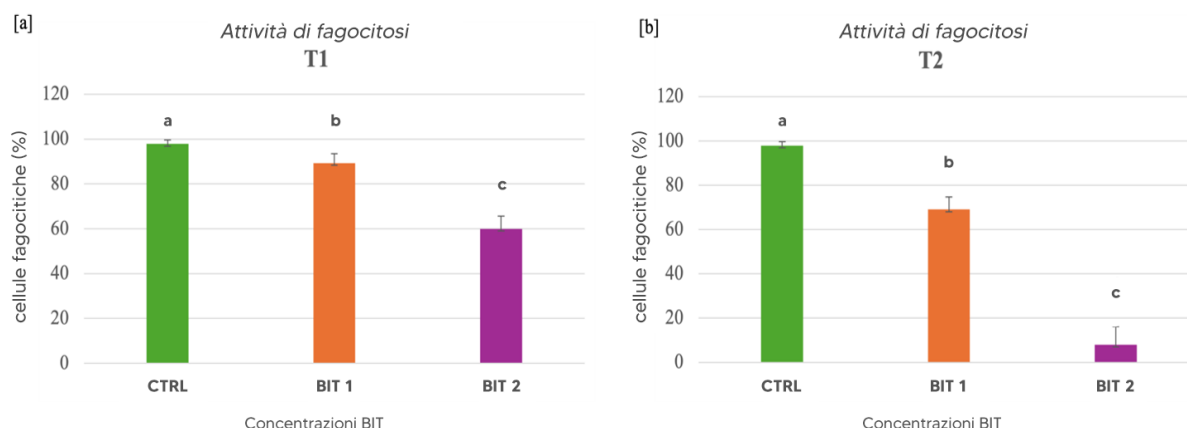
L'ANOVA a una via è stata utilizzata per affermare la differenza tra i gruppi CTR e quelli sperimentali e per confrontare i gruppi B1 e B2 tra loro. I valori sono presentati come media ± SD (n = 6). a-b: lettere di apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi (p < 0.05 post hoc Tukey test).

3.3.3.2. Valutazione dell'attività Fagocitaria

L'attività fagocitaria degli emociti esposti a diverse concentrazioni di BIT (B1: 0,03 µg/L; B2: 0,3 µg/L) a diversi tempi di esposizione sperimentale (T1: 1h; T2: 3h) ha mostrato cambiamenti dipendenti dalla concentrazione e dal tempo. La Figura 14(a) mostra i risultati della capacità fagocitica degli emociti esposti a B1 e B2 al tempo di esposizione più basso (T1). In particolare, sono state osservate differenze significative (p<0,01) tra i due gruppi sperimentali (B1 89,33 ± 0,04% e B2 60,00 ± 0,11%) rispetto al gruppo di controllo (CTR 97,83 ± 0,02%). Un'altra differenza significativa (p<0,01), riportata nella Figura 14(a;b), è stata osservata tra i gruppi sperimentali esposti alle due diverse concentrazioni di BIT, cioè B1 rispetto a B2. La Figura 14(b) mostra gli effetti sull'attività fagocitaria degli emociti esposti a B1 e B2 al tempo di esposizione più lungo (T2). I risultati evidenziano una riduzione della capacità fagocitica con l'aumento della concentrazione di BIT. In particolare, sono state osservate differenze significative (p<0,01) tra i due gruppi

sperimentali esposti alla BIT (B1 $69,00 \pm 0,11\%$ e B2 $11,75 \pm 0,07\%$) rispetto al gruppo di controllo (CTR $97,83 \pm 0,02\%$). È stata osservata una differenza significativa ($p < 0,01$) anche in questo caso tra i due gruppi sperimentali esposti a B1 e B2.

Figura 14: Effetti sull'attività di fagocitosi degli emociti dopo esposizione a BIT (B1: $0,03 \mu\text{g/L}$; B2: $0,3 \mu\text{g/L}$) ai tempi (a) T1 (1h) e (b) T2 (3h).



L'ANOVA a una via è stata utilizzata per affermare la differenza tra la CTR e i gruppi sperimentali e per confrontare i gruppi B1 e B2 tra loro. I valori sono presentati come media $\pm$ SD ($n = 6$). a-b: lettere di apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$ post hoc Tukey test).

3.3.3.3. Regolazione del volume cellulare

In condizioni fisiologiche, le cellule della ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* hanno mostrato la capacità di modulare il loro volume aumentando o diminuendo la loro area cellulare quando sono esposte a soluzioni con un'osmolarità diversa da quella fisiologica (vedere la freccia nelle Figura 15A e 15B). Ad esempio, se esposte a una soluzione ipotonica, le cellule sono in grado di tornare alla loro forma originale dopo un iniziale e graduale ingrandimento. Come mostrato nella Figura 15A, le cellule esposte al BIT per 1 ora hanno mostrato un andamento divergente rispetto al controllo. Infatti, le cellule esposte alla concentrazione più bassa (B1) hanno mostrato un maggiore aumento dell'area cellulare, mentre quelle esposte alla concentrazione più alta (B2) non sono state in grado di aumentare la loro area in risposta alla soluzione ipotonica e hanno subito un restringimento dopo l'analisi, non riuscendo a tornare in ogni caso alla loro dimensione

originale. Un modello simile è stato osservato dopo tre ore di esposizione al composto (Figura 15B). In questo caso, le cellule esposte a B1 sono rimaste gonfie, dimostrando di non essere in grado di tornare alla loro struttura originale. Analogamente a quanto osservato a un'ora di distanza, le cellule esposte a B2 hanno mostrato un rigonfiamento naturale anziché subire un restringimento. L'analisi statistica ha rivelato una differenza significativa nelle cellule esposte al BIT sia a un'ora che a tre ore. C'è stata una differenza significativa tra le cellule di controllo e quelle esposte a B2, nonché tra le cellule esposte alle due concentrazioni ($p < 0,01$).

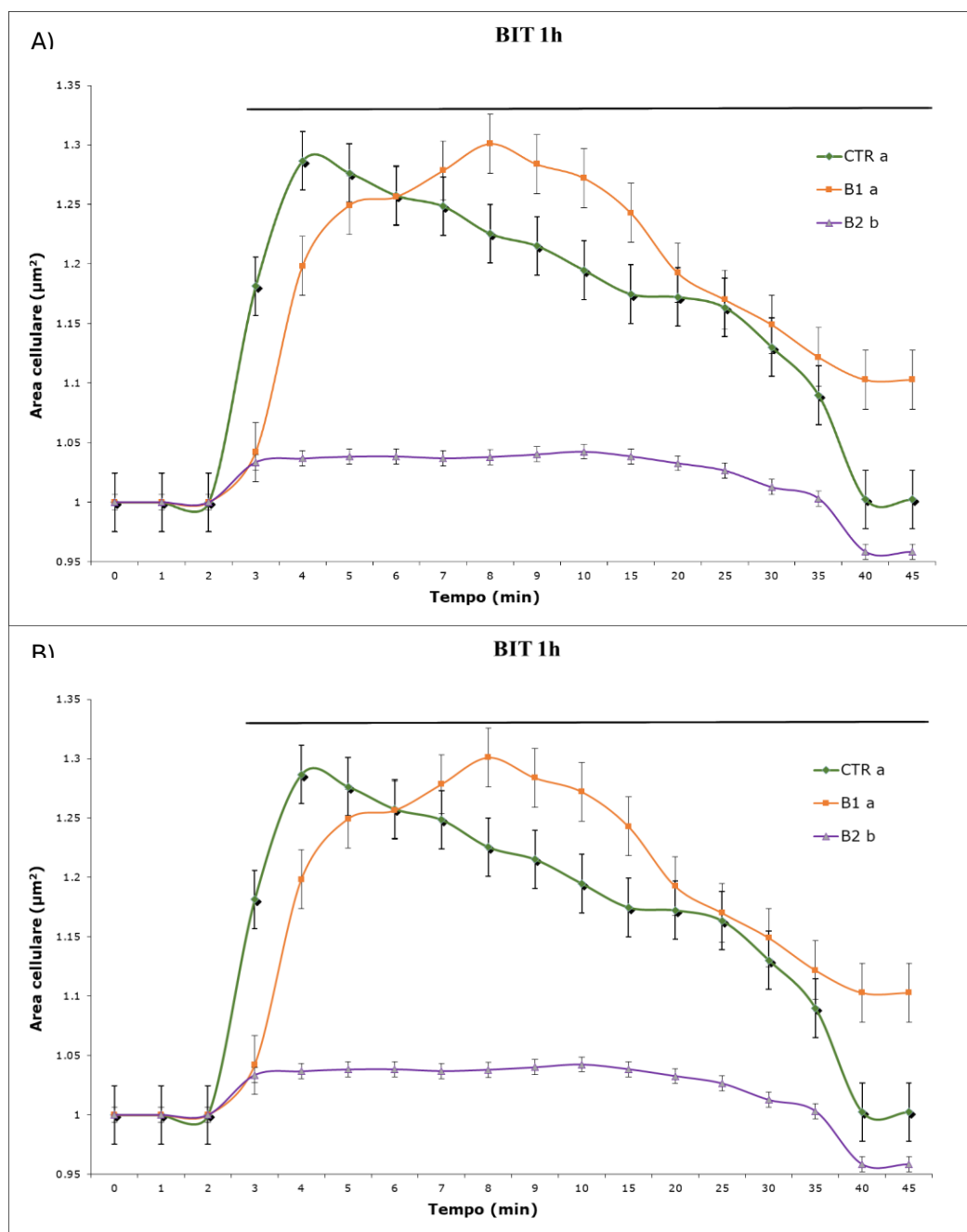


Figura 15: Diminuzione del volume di regolazione (RVD) delle cellule GD di *M. galloprovincialis* esposte per 1h alla BIT (14A) e per 3h (14B). Le curve rappresentano le variazioni del volume cellulare nel tempo (min) in risposta alla soluzione ipotonica. I cerchi (●) rappresentano il controllo (0 µg/L); i quadrati (■) rappresentano il gruppo B1 (0,03 µg/L di BIT); i triangoli (▲) rappresentano il gruppo B2 (0,3 µg/L di BIT). La linea indica la transizione da una soluzione isotonica a una soluzione ipotonica. I dati sono stati espressi come area cellulare media $\pm$ SD di misurazioni in triplo. La One-way ANOVA è stata utilizzata per affermare la differenza tra la CTR e i gruppi sperimentali e per confrontare i gruppi B1 e B2 tra loro. a-b: lettere di apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$ post hoc Tukey test).

3.3.4. Discussioni

Nell'ultimo decennio, l'uso del BIT nella formulazione di vari prodotti di consumo è aumentato (Novick et al., 2012). Prodotti per la cura della persona, detergenti per la casa, detersivi e biocidi industriali che sfruttano le proprietà conservanti di questa sostanza chimica sono ampiamente disponibili sul mercato globale e, una volta giunti al termine del loro ciclo di vita o durante il loro utilizzo, a volte anche durante la preparazione a livello industriale, vengono rilasciati nell'ambiente. Valutazioni hanno appurato che le molecole di BIT presentano un tempo di degradazione superiore a 30 giorni o addirittura superiore a 3 mesi se esposti alla luce solare, proprio per le proprietà biocide che presentano (Lugg, 2001; EPA, 2009). Ciò ha portato a una sempre più crescente preoccupazione per i potenziali effetti negativi che la presenza di BIT può avere sugli animali acquatici. Il mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) è un buon modello sentinella per il monitoraggio dei danni alle comunità marine (Impellitteri et al., 2024; Filice et al., 2024). In particolare, gli emociti e le cellule GD dei mitili si sono rivelati bersagli ottimali per testare gli effetti di potenziali contaminanti rilasciati nell'ambiente, grazie al loro coinvolgimento nei meccanismi di difesa, nella digestione e nel metabolismo di xenobiotici (Curpan et al., 2022; Pagano et al., 2023). In questo contesto, l'approccio in vitro può essere utile per comprendere meglio le risposte cellulari specifiche su determinate cellule bersaglio prima di valutare gli effetti dei contaminanti emergenti attraverso l'esposizione in vivo (Cruz et al., 2023; Multisanti et al., 2023). Il presente studio ha dimostrato come la diminuzione della vitalità degli emociti osservata durante l'esposizione a diverse concentrazioni di BIT era indicativa di un'interazione tra la sostanza chimica testata e *M. galloprovincialis*. In particolare, la significativa riduzione della vitalità cellulare osservata dopo 3 ore di esposizione alla concentrazione più elevata di BIT può essere un chiaro segno di alterazione della stabilità della membrana lisosomiale e di effetti citotossici (Impellitteri et al., 2024b; Multisanti et al., 2024; Porretti et al., 2023). In quanto i lisosomi sono direttamente coinvolti nella seconda linea di difesa e nella risposta a condizioni di stress esterno, con conseguente alterazione della loro capacità di adattamento, che a sua volta porta a una riduzione della vitalità cellulare

(Canesi et al., 2007). La diminuzione della vitalità degli emociti, causata dalla dose e dal tempo di esposizione, è una risposta comune degli emociti di organismi marini esposti a inquinanti, come già osservato negli emociti del mollusco bivalve *Pinctada imbricata* trattati *in vitro* con il conservante quaternium-15 (Multisanti et al., 2024). Questi risultati sono strettamente correlati anche all'alterazione della capacità di fagocitosi, uno dei principali meccanismi di difesa che prevede la fusione di lisosomi e fagosomi e che è innescato da diversi segnali (Burgos-Aceves & Faggio, 2017). In effetti, l'esposizione al BIT ha causato una riduzione significativa di tale capacità, con una percentuale inferiore al 20% di cellule capaci di fagocitosi dopo 3 ore di esposizione alla concentrazione più alta. Questi risultati sottolineano l'impatto negativo del BIT sulle prestazioni delle cellule, con possibili effetti negativi sui recettori della superficie cellulare che non sono più in grado di fagocitare, come riportato in altri studi che hanno valutato la capacità delle cellule di *M. galloprovincialis* di effettuare la fagocitosi in condizioni di stress (Multisanti et al., 2023; Parisi et al., 2021; Panebianco et al., 2023). Al contrario, i risultati ottenuti sulla vitalità delle cellule GD hanno mostrato un precoce adattamento delle cellule alla condizione di stress causata dall'esposizione alle sostanze chimiche; questo adattamento è già stato osservato in altri test *in vivo* su cellule di GD di *M. galloprovincialis* (Pagano et al., 2022). La riduzione della vitalità osservata durante l'analisi è coerente anche con i risultati di un precedente studio sulla tossicità della BIT sui pesci zebra di Li et al., 2016, in cui l'esposizione a 0.2 mmol/L di BIT ha causato il 100% di mortalità negli animali trattati. Gli effetti dannosi del BIT sulle cellule della GD sono stati evidenziati anche dall'alterazione della loro capacità di regolare il volume in risposta a soluzioni osmotiche. In condizioni naturali, le cellule della GD dei bivalvi sono in grado di espandersi e contrarsi, e quindi di modificare il loro volume, in risposta alle variazioni di osmolarità. Ciò consente loro di recuperare la struttura originaria quando sono esposte a soluzioni iper- o ipo-osmotiche, ma in condizioni di stress questa capacità può essere persa e le cellule non possono tornare alle loro dimensioni originali. Il secondo scenario è quello riscontrato nelle cellule GD esposte a BIT2, che non sembrano essere in grado di espandersi e di tornare alla forma iniziale dopo 1 e 3 ore di esposizione. Questi risultati possono essere correlati a possibili danni ai canali proteici o ai livelli citoscheletrici dovuti

all'interazione tra le cellule e la BIT, che ha dimostrato di causare la denaturazione e l'inattivazione delle proteine (Collier et al., 1990). Inoltre, risultati analoghi sono stati documentati in vivo in studi condotti su *M. galloprovincialis* con l'impiego di conservanti come la BIT utilizzati nei prodotti di consumo (Impellitteri et al., 2024b; Burgos-Aceves et al., 2017).

3.3.5. Conclusioni

L'esposizione delle cellule di *M. galloprovincialis* al benzisotiazolinone ha condotto all'osservazione di danni fisiologici e cellulari in diversi endpoint di tossicità. In particolare, è stata osservata una riduzione della vitalità degli emociti in seguito all'esposizione dell'emolinfa al tempo di esposizione più lungo e alla concentrazione più alta; una riduzione della vitalità delle cellule proveniente dalla GD è stata osservata anche in seguito all'esposizione al tempo di esposizione più breve e alla concentrazione più bassa di BIT. La capacità fagocitica degli emociti esposti al BIT è risultata alterata in modo dipendente dal tempo e dalla dose. I risultati di questo studio indicano la necessità di ulteriori indagini sugli effetti del BIT a livello ambientale, con particolare attenzione ai suoi effetti sugli organismi acquatici, poiché questa area rimane relativamente ancora inesplorata. È fondamentale condurre studi futuri *in vivo* per confermare e approfondire questi risultati e comprendere meglio l'impatto complessivo del BIT sugli ecosistemi acquatici. Gli studi *in vivo* possono fornire una valutazione più completa degli effetti cronici e subletali del BIT in condizioni ambientali realistiche. Parallelamente, è cruciale promuovere la ricerca di alternative più sicure e sostenibili ai biocidi tradizionali. L'adozione di approcci integrati che combinino l'uso di sostanze naturali con tecnologie di mitigazione avanzate potrebbe rappresentare una strategia promettente per ridurre l'impatto ambientale dei prodotti chimici di sintesi.

3.4. Bergamotto (*Citrus bergamia*): un nuovo potenziale agente nutraceutico per contrastare le alterazioni indotte dal Sodio Lauril Solfato in *Mytilus galloprovincialis*

3.4.1. Premesse

L'inquinamento delle acque con sostanze chimiche prodotte dall'uomo ha un impatto negativo sulla coltivazione dei pesci e sulle comunità animali che vi vivono (Köprücü & Aydın, 2004; Ural & Sağlam, 2005; Sula et al., 2020a,b). Negli ultimi anni, si è assistito a un notevole aumento dell'interesse per il potenziale dei nutraceutici nel mitigare gli effetti nocivi degli inquinanti emergenti. I nutraceutici, che comprendono un'ampia gamma di composti bioattivi naturali derivati da piante, organismi marini e microrganismi, hanno dimostrato attività biologiche promettenti che migliorano le funzioni fisiologiche e promuovono la salute generale. Questa crescita della ricerca scientifica evidenzia il loro potenziale come soluzioni sostenibili per contrastare la tossicità indotta dagli inquinanti, offrendo approcci innovativi per rispondere alla pressante necessità di strategie di mitigazione efficaci e rispettose dell'ambiente (Debnath et al., 2024; Hamed et al., 2021; Jindal et al., 2024; Pastaki et al., 2023) per valutare l'efficacia di questi metodi nel mitigare gli effetti negativi dei contaminanti emergenti sugli organismi acquatici (Ahmadniaye Motlagh et al., 2023; Banaee et al., 2023). In questo studio, il bergamotto (*Citrus bergamia*) è stato scelto come potenziale nutraceutico da analizzare.

Quasi tutte le specie di agrumi sono originarie delle regioni subtropicali o tropicali dell'Asia e della Malesia; il loro arrivo in Italia risale al XVII secolo circa. Questa pianta ha un'ampia distribuzione che va dal bacino del Mediterraneo al Sud America. La dieta mediterranea (Md), definita come parte del “patrimonio culturale immateriale dell'umanità”, è correlata a un miglioramento della salute, soprattutto per quanto riguarda la riduzione dell'incidenza di cancro, diabete mellito e, in modo ancora più significativo, di malattia coronarica in Italia (Maiuolo et al., 2021). In particolare, la riduzione dell'assunzione di carne rossa e l'aumento del consumo di olio d'oliva e di

alimenti di origine vegetale fanno sì che la Md abbia un impatto positivo sull'insorgenza e sulla progressione delle malattie cardiache (Maiuolo et al., 2021). In questo contesto il bergamotto ha inoltre attirato l'attenzione dell'industria profumiera e farmaceutica per la sua composizione chimica, che comprende diversi oli essenziali bioattivi come il limonene, un monoterpene, il linalolo, l'acetato di linalile, il γ -terpinene e il β -pinene. (Costa et al., 2010). È inoltre ricca di glicosidi flavonoidi, come la neoeriocitrina, la neoesperidina, la naringina, e di polifenoli glicosilati, come la bruteridina e la melitidina (Salerno et al., 2016). Gli oli essenziali estratti da *C. bergamia* sono stati utilizzati come rimedi per varie malattie, come infezioni parassitarie, mal di gola e guarigione delle ferite, grazie alle loro proprietà antisettiche e antibatteriche, derivate dalla medicina popolare tradizionale (Navarra et al., 2015; Russo et al., 2015; Musolino et al., 2019).

Inoltre, questo studio analizza il potenziale del bergamotto nel mitigare o prevenire i danni indotti da SLS in organismi modello acquatici. Dall'avvento della pandemia di COVID-19, l'uso di detergenti, disinfettanti e agenti schiumogeni in ambito sanitario e industriale è aumentato notevolmente. Questo aumento è dovuto alla necessità di mantenere elevati standard igienici e di controllare la proliferazione microbica, riflettendo un maggiore impegno nel ridurre il rischio di infezioni (Impellitteri et al., 2024a; Multisanti et al., 2024). I prodotti per l'igiene e la cura della persona contengono nelle loro formulazioni diverse sostanze, tra cui i tensioattivi. Queste molecole sono ingredienti essenziali di molti detergenti per la casa grazie alle loro proprietà tensioattive. Inoltre, sono ampiamente utilizzate in vari processi industriali, nella pulizia domestica e nella produzione di pesticidi, e sempre più riconosciute come contaminanti emergenti (Impellitteri et al., 2023). Tra i tensioattivi più conosciuti, il sodio lauril solfato (SLS) è un esempio importante (Chirani et al., 2021). L'SLS è un detergente anionico noto per le sue proprietà antimicrobiche. È ampiamente utilizzato come agente detergente sintetico in diversi prodotti chimici per la pulizia domestica, inclusi i detersivi per bucato e lavastoviglie (Freitas et al., 2021; Zicarelli et al., 2022) hanno indicato che l'SLS può entrare nell'ambiente principalmente attraverso l'applicazione di fanghi di depurazione sul terreno, lo scarico di acque reflue da impianti di trattamento e il rilascio di rifiuti industriali nei fiumi e nelle aree costiere. Sebbene l'SLS si biodegradi dal 45% al 95% entro 24 ore, il

suo continuo rilascio nell'ambiente porta a livelli di inquinamento persistentemente elevati nei sistemi acquatici (Cserhádi et al., 2002). In questa ottica di studio, gli studi di Freitas e colleghi (2020; 2021; 2023) hanno appurato gli effetti tossici del sodio lauril solfato sul *Mytilus galloprovincialis*.

Questo studio esamina i potenziali effetti benefici e protettivi degli estratti di succo di bergamotto della cultivar “Fantastico” sulla cozza mediterranea (*Mytilus galloprovincialis*) esposta a SLS. La cozza è stata scelta come organismo modello in quanto presenta caratteristiche biologicamente appropriate (Curpan et al., 2022; Impellitteri et al., 2023; Multisanti et al., 2023; Torre et al., 2013). Gli effetti sono stati valutati esaminando i cambiamenti a livello cellulare e fisiologico nell'emolinfa, nella GD e nelle cellule branchiali. In particolare, gli emociti svolgono un ruolo chiave nella risposta immunitaria iniziale dell'organismo agli xenobiotici e agli agenti patogeni. La GD funziona come sito primario di disintossicazione, il che la rende un organo bersaglio critico per i contaminanti. Le branchie, d'altra parte, rappresentano uno dei primi punti di contatto tra l'organismo e l'ambiente, in quanto sono direttamente esposte durante il processo di filtrazione, che fornisce all'organismo nutrienti e ossigeno. Inoltre, è stato quantificato e analizzato qualitativamente il rendimento energetico dell'organismo attraverso la produzione di bisso. In conclusione, sono state condotte analisi specifiche per valutare macromolecole chiave, tra cui i lipidi totali e il contenuto di acidi grassi, le proteine totali, i tocoferoli e i carotenoidi, che svolgono ruoli cruciali nel mantenimento delle funzioni fisiologiche e metaboliche degli organismi oltre che essere fonte di componenti essenziali nell'alimentazione (quali ad esempio gli acidi grassi essenziali). I macronutrienti, come i lipidi e le proteine, sono coinvolti in molte funzioni vitali degli organismi acquatici. Hanno già dimostrato di essere utili marcatori trofici per tracciare le relazioni predatore-preda e definire le reti alimentari dell'ambiente marino (De Troch et al., 2012; Kelly & Scheibling, 2012). Inoltre, lipidi e acidi grassi sono essenziali per l'immagazzinamento dell'energia, la struttura delle membrane e i processi di segnalazione; le proteine, invece, sono i mattoni fondamentali per le strutture cellulari e gli enzimi, sostenendo la crescita e la riparazione. I tocoferoli e i carotenoidi sono antiossidanti essenziali che proteggono le cellule dallo stress ossidativo. L'obiettivo di

questo studio è stato valutare come la co-presenza di un composto naturale, potesse o meno ristabilire i parametri fisiologici e il profilo nutrizionale del mitilo, gettando le basi per proporre l'uso di tali sostanze per mitigare l'impatto dei comuni contaminanti ambientali sugli organismi.

3.4.1.1. Regolamenti sul Sodio lauril solfato

Il sodio laurilsolfato (SLS), noto anche come sodio dodecil solfato, è un tensioattivo anionico con la formula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ (Figura 16), comunemente utilizzato come agente emulsionante nei prodotti per la pulizia della casa, come detersivi per il bucato, detergenti spray e per lavastoviglie, cosmetici, e prodotti per la cura della persona, come shampoo. La concentrazione di SLS presente nei prodotti di consumo varia a seconda del prodotto e del produttore, ma in genere va dallo 0,01% al 50% nei prodotti cosmetici (CIR, 1983; CIR, 2005) e dall'1% al 30% nei prodotti per la pulizia (Proctor & Gamble, 2015; Seventh Generation, 2015). L'SLS può essere sintetico o di origine naturale. L'SLS (MW 288,38 g/mol; pH 7,2) è un composto non volatile, solubile in acqua (100-150 g/L a temperatura ambiente) con un coefficiente di ripartizione ($\log P_{ow}$) di 1.6, che lo rende relativamente idrofilo (GuideChem, 2015; OECD, 2015). In genere, i composti idrofili hanno un basso coefficiente di adsorbimento nel suolo/sedimento e bassi fattori di bioconcentrazione (BCF). Il BCF per l'SLS è compreso tra 2.1 e 7.1 (GuideChem, 2015; OECD, 2015).

Al momento non esistono linee guida o raccomandazioni normative dell'UE relative all'accettabilità di sodio lauril solfato (SLS) nei medicinali o nei prodotti per la cura della persona. Ma L'ECHA ha inserito il SLS nel Regolamento REACH, in quanto è nocivo se ingerito, provoca gravi danni agli occhi, è nocivo per la vita acquatica con effetti di lunga durata, è nocivo se inalato, provoca irritazione cutanea e può causare irritazione respiratoria.

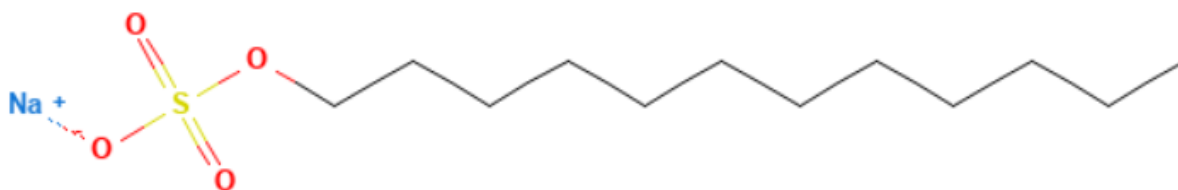


Figura 16: struttura chimica del sodio lauril solfato (EMA, 2015)

3.4.1.2. SLS nei prodotti per la cura della persona e nell'ambiente

I solfati sono composti che hanno proprietà idrofile e idrofobe (anfipatiche) che permettono loro di fungere da solventi e da agenti schiumogeni nei saponi, nei cosmetici e negli alimenti. Risultano di ampio utilizzo per le loro proprietà, in quanto sono capaci di eliminare l'olio da capelli e pelle se usati all'interno di saponi.

Tra questi i più usati risultano il sodio lauril solfato (SLS) e il sodio laureth solfato. Il Lauril solfato di Sodio (SLS), un detergente anionico, presenta un'attività antimicrobica ed è ampiamente utilizzato come agente detergente sintetico in diversi prodotti per la cura della persona e cosmetici (shampoo, balsami, dentifrici, oli o sali da bagno, creme per le mani, maschere, ecc.). Inoltre, è presente in prodotti per la pulizia domestica come detersivi per il bucato e detersivi per lavastoviglie.

Pur avendo una natura biodegradabile (Bondi et al., 2015) è raramente monitorata e rimane non regolamentata in quanto ritenuta "ecologica", ma vi sono studi atti a valutare il livello di tossicità dell'SLS (Bromage & Fuchs, 1976; Lagerspetz & Tiiska, 1993; Hemmer et al., 1992; Ishida & Kobayashi, 1995; Madhyastha & Nayak, 1984; Tovell et al., 1975; Sayed & Authman, 2018; Freitas et al., 2021; Freitas et al., 2020) o la sua concentrazione nell'ambiente (EPA, 2019; Shipley, 2014; Bhattacharya et al., 2021).

La concentrazione di SLS presente nei prodotti di consumo dipende dal prodotto e dal produttore, ma in genere varia dallo 0,01% al 50% nei prodotti cosmetici (Bondi et al., 2015; CIR, 1983, 2005) e dall'1% al 30% nei prodotti per la pulizia (Bondi et al., 2015; Proctor & Gamble (P&G), 2015; Seventh Generation, 2015). La sua presenza è indicativa dell'uso pervasivo di detergenti, materiali per la pulizia e altri prodotti di consumo (Roberts et al., 1982; Asio et al., 2023). Nonostante le sue proprietà biodegradanti, l'SLS

può ancora essere rilevato negli effluenti, anche se a livelli minimi. Sebbene la biodegradazione dell'SLS vada dal 45% al 95% entro 24 ore, l'introduzione continua di SLS nell'ambiente mantiene i livelli di questo inquinante elevati nei sistemi acquatici (Cserhádi et al., 2002). In particolare, nelle aree costiere della baia di Cadiz, in Spagna, sono state registrate concentrazioni di SLS comprese tra 0,48 e 1,80 mg/L (Quiroga et al., 1989).

3.4.2. Materiali e Metodi

3.4.2.1. Disegno Sperimentale

Durante l'esperimento sono stati raccolti 200 molluschi bivalvi della specie *Mytilus galloprovincialis*, ciascuno delle dimensioni approssimativamente simili. Il peso medio dei visceri era di $4,45 \pm 1,37$ g, mentre la lunghezza della conchiglia era di $5,23 \pm 0,55$ cm in lunghezza e $2,48 \pm 0,23$ cm in larghezza. I molluschi sono stati procurati da un allevamento commerciale situato nel Lago di Faro dalla società FARAU SRL, Frutti di Mare di Messina, Italia. Gli esemplari sono stati suddivisi in quattro gruppi (due repliche di 25 animali per gruppo) e acclimatati per circa due settimane in otto acquari da 25 L ciascuno, dotati di aeratori per l'ossigeno. Le concentrazioni nei gruppi di esposizione erano le seguenti: SLS (CAS n. 1335-72-4, Sigma-Aldrich, 0.010 mg/L), estratto di bergamotto (BRG, 5 mg/L), MIX (0,010 mg/L SLS + 5 mg/L BRG). I mitili sono stati trattati per 14 giorni, oltre al gruppo di controllo non trattato (CTR). Sono state preparate scorte di soluzioni standard di SLS, BRG e MIX alla concentrazione sopra indicata. L'acqua di ciascun acquario è stata cambiata tre volte alla settimana e la concentrazione delle sostanze chimiche è stata mantenuta costante. Non si è osservata alcuna mortalità durante tutto il periodo di esposizione. Ai molluschi è stata fornita acqua di lago filtrata e arricchita di nutrienti, fornita dalla stessa azienda che aveva precedentemente rifornito gli animali durante l'esperimento. La salinità dell'acqua era pari a $3,4 \pm 0,05\%$, il pH a $7,5 \pm 0,01$ e la temperatura a $18,32 \pm 0,11$ °C. La stanza sperimentale era illuminata da luce naturale. Dopo ogni cambio d'acqua, sono stati misurati la salinità, il pH e la temperatura dell'acqua.

3.4.2.2. Raccolta dei campioni

Dopo l'esposizione, per l'analisi del profilo nutrizionale sono stati selezionati a caso n=10 organismi da ogni vasca del gruppo sperimentale, le cui viscere sono state sezionate, riunite, liofilizzate, macinate in polvere e conservate a -80°C fino all'esecuzione delle analisi. Sono stati valutati i lipidi totali, le proteine, la composizione in acidi grassi, il tocoferolo e i carotenoidi. Per convertire i dati dal peso secco al peso umido, è stato valutato il contenuto di umidità di ogni gruppo di mitili (circa 1 g). Per identificare il numero e la lunghezza delle placche bissali, sono stati selezionati a caso quattro esemplari di cozze da ciascun gruppo sperimentale.

3.4.2.3. Analisi del Bisso

Dopo il periodo di acclimatazione, il bisso è stato tagliato il più vicino possibile alla conchiglia con forbici chirurgiche. Due esemplari sono stati quindi trasferiti singolarmente in piastre di Petri di vetro e collocati nelle rispettive vasche. Dopo un periodo di esposizione di 14 giorni, il bisso è stato accuratamente staccato dal mollusco e la lunghezza e il numero delle singole placche sono stati quantificati utilizzando una fotocamera AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) con immagini acquisite tramite il software AxioVision AC Rel. 4.5.

3.4.2.4. Lipidi Totali e composizione degli Acidi Grassi

L'estrazione dei lipidi dai mitili in pool è stata condotta secondo le linee guida dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE, 2012). Ogni campione liofilizzato e polverizzato (circa 4 g) è stato omogeneizzato con 40 mL di una miscela di cloroformio e metanolo (1:2, v/v, grado HPLC, Carlo Erba), quindi posto in un bagno a ultrasuoni per 30 minuti. Successivamente, la miscela è stata addizionata con 10 mL di NaCl allo 0,73%, agitata e quindi centrifugata a 6.300×g per 10 minuti (Awel Industries, Francia, modello MF 20-R). La fase inferiore di cloroformio è stata quindi trasferita in una beuta. La fase superiore è stata nuovamente estratta secondo la stessa

procedura e le due fasi di estrazione sono state combinate. Le fasi combinate sono state filtrate con solfato di ammonio anidro e poi essiccate. Successivamente, è stata determinata gravimetricamente la resa di estrazione su base di peso fresco (fw) e l'estratto lipidico è stato recuperato con 1 mL di *n*-esano, addizionato con 1 mL di metossilato di sodio e riscaldato a 100 °C per 15 minuti. Dopo il raffreddamento della miscela, è stato aggiunto 1 mL di trifluoruro di boro/metanolo (14%) e la miscela è stata riscaldata nuovamente nelle stesse condizioni. La miscela raffreddata è stata poi riscaldata nelle stesse condizioni, aggiungendo circa 1 mL di *n*-esano e 4 mL di una soluzione satura di cloruro di sodio.

Lo strato organico contenente gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) è stato raccolto e analizzato con un gascromatografo (GC) dotato di un iniettore split/splitless e di un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (Dani Master GC1000, Dani Instrument, Milano, Italia). È stata utilizzata una colonna capillare Supelco SLB-IL100, lunga 60 m, con diametro interno di 0,25 mm e spessore del film di 0.20 µm (Supelco, Sigma-Aldrich, USA). Sono stati utilizzati i seguenti parametri operativi: un programma di temperatura del forno a 60 °C per 2 minuti a una velocità di 13 °C/min, 150 °C a una velocità di 2 °C/min e una temperatura finale di 24 °C. La temperatura è stata mantenuta a 0 °C per 10 minuti, con le temperature dell'iniettore e del rivelatore rispettivamente di 220 °C e 250 °C.

3.4.2.5. Proteine Totali

La proteina grezza è stata determinata per ogni campione in polvere (circa 1 g) costituito da cozze in pool, utilizzando il metodo Kjeldahl già proposto in un precedente lavoro su organismi marini (Porretti et al., 2023). Per la metodica utilizzata si rimanda al Paragrafo 3.1.2.5.

3.4.2.6. Carotenoidi

L'analisi e la quantificazione dei carotenoidi, espressi in termini di β -carotene, sono state eseguite su 0.5 g di campione liofilizzato adattando il metodo proposto da Rotondo et al., (2021), con l'aggiunta di 10 mL di *n*-esano, l'estrazione a bagnomaria a ultrasuoni per 10 minuti e la miscela è stata centrifugata per 10 minuti a 4000 giri/min a 25 °C. Il surnatante è stato separato e la fase solida è stata nuovamente estratta con la stessa quantità di *n*-esano. Le fasi surnatanti sono state unite e asciugate con un Rotavapor (Büchi V700, BUCHI labortechnik AG). Dopo l'evaporazione, i campioni sono stati sciolti in 2 mL di metanolo e metil-terz-butil-etere (MTBE) in rapporto 1:1.

3.4.2.7. Tocoferoli

L'analisi e la quantificazione dei tocoferoli sono state eseguite sulla frazione di lipidi totali estratti con il metodo Folch e diluiti (10%, v/v) in cloroformio/metanolo (1:1). Il prodotto è stato filtrato attraverso un filtro di nylon da 0,2 μ m, trasferito in una fiala ambrata e analizzato mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a un rivelatore di fluorescenza (HPLC-FD) (Shimadzu, Milano, Italia) secondo il protocollo di Lo Turco e colleghi (Lo Turco et al., 2023). È stata utilizzata una colonna LiChrosorb Si 60 (5 μ m) (4,6 mm i.d. $\times$ 250 mm) (Merck, Darmstadt, Germania), protetta da una colonna di guardia LiChroCART 4-4 con la stessa fase stazionaria (Merck, Darmstadt, Germania). Come fase mobile è stata utilizzata una soluzione di *n*-esano/etilacetato (90:10 v/v). Il volume di iniezione è stato pari a 20 μ L. Le analisi sono state eseguite a 40 °C in condizioni isocratiche con una velocità di flusso di 0.8 mL/min. Le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione della fluorescenza erano rispettivamente 295 e 330 nm. I dati sono stati acquisiti e gestiti tramite il software LabSolutions ver. 5.10.153 (Shimadzu). I tocoferoli sono stati identificati confrontando i tempi di ritenzione di riferimento degli standard commerciali di α -, γ - e δ -tocoferolo. La quantificazione è stata eseguita con il metodo della calibrazione esterna, utilizzando curve di calibrazione a sei punti per ciascun tocoferolo. Il contenuto totale di tocoferolo è stato calcolato come somma dei singoli tocoferoli. Tutte le determinazioni sono state eseguite in triplo.

3.4.2.8. Analisi Statistica

I dati sperimentali relativi all'analisi del bisso, del contenuto totale di lipidi, della composizione degli acidi grassi, del contenuto totale di proteine e del contenuto in carotenoidi e tocoferoli sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard dell'analisi condotta in triplicato. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software Graphpad Prism, versione 5 (Graphpad Software Ltd., USA, 2003). Per le analisi comparative multiple tra gruppi sperimentali e di controllo è stata seguita l'analisi one way-ANOVA, a cui è seguito un post-hoc Tukey test. È stato sempre accettato un livello di significatività statistica pari a $p < 0,05$.

3.4.3. Risultati

3.4.3.1. Alterazioni del Bisso

L'esposizione a SLS, al bergamotto e alla loro miscela ha determinato una variazione del numero di placche bissali e della loro lunghezza (Tabella 11, Figura 17). La tabella mostra il numero medio di placche dopo 14 giorni di esposizione. Si può osservare che il numero di placche nel gruppo trattato con SLS ($60,75 \pm 19,31$) è significativamente inferiore rispetto a quello del gruppo di controllo ($102,75 \pm 14,93$), e che tale numero è ulteriormente diminuito 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 mostrato che le medie tra il controllo e la miscela, e tra il bergamotto e la miscela, erano significativamente diverse ($p < 0,05$). La tabella 11 mostra i cambiamenti osservati nella lunghezza delle piastre in seguito all'esposizione ai composti in questione. Si osserva una riduzione della lunghezza media rispetto al gruppo di controllo ($0,76 \pm 0,14$). Infatti, nei gruppi SLS e BRG la lunghezza media era di $0,61 \pm 0,12$ e $0,61 \pm 0,11$, mentre nel gruppo MIX era di $0,65 \pm 0,14$. L'analisi statistica ha rivelato una differenza statisticamente significativa tra il controllo e tutti i gruppi sperimentali ($p < 0,05$).

Tabella 11: Numero di placche bissali di *M. galloprovincialis* rilevate allo stereomicroscopio nei gruppi di controllo e di trattamento (SLS, BRG, MIX). I dati sono presentati come media $\pm$ SD di analisi in doppio.

	Gruppi Testati			
	Controllo	SLS	BRG	MIX
Numero di placche bissali	$102,75 \pm 14,93^a$	$60,75 \pm 19,31^a$	$101,75 \pm 30,18^{a,b}$	$38,00 \pm 29,47^{a,c}$
Lunghezza placche bissali	$0,76 \pm 0,14^a$	$0,61 \pm 0,12^b$	$0,61 \pm 0,11^{b,c}$	$0,65 \pm 0,14^{b,c,d}$

a-c: lettere apici diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$ post-hoc Tukey test); le stesse lettere apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0,05$ post-hoc Tukey test).

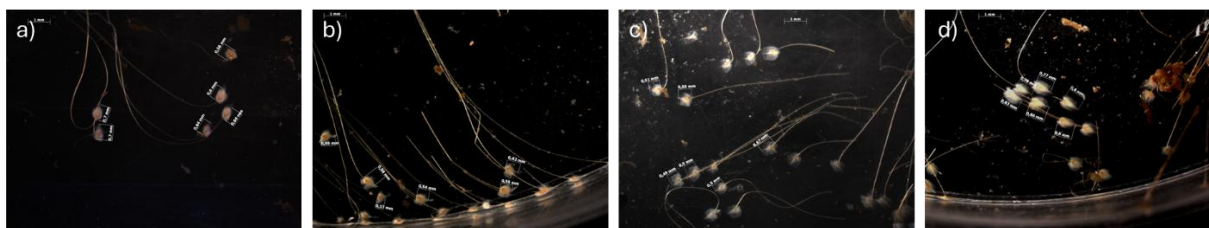


Figura 17: Immagini rappresentative di cozze di bisso ottenute con lo stereomicroscopio AxioCam MRc 5 e acquisite con il software AxioVision AC Rel. 4.5. Le immagini mostrano i cambiamenti nella lunghezza della piastra dal gruppo di controllo (Figura 17a) ai gruppi di esposizione SLS (Figura 17b), BRG (Figura 17c) e MIX (Figura 17d) dopo 14 giorni di esposizione.

3.4.3.2. *Lipidi Totali e Composizione in Acidi Grassi*

I risultati del contenuto totale di lipidi e del profilo di FA ottenuti dai 4 gruppi sperimentali sono riportati nella Tabella 12 seguente. Il gruppo di controllo ha mostrato un contenuto lipidico totale del 2,21% fw, mentre il gruppo esposto a SLS ha mostrato un netto calo, con l'1,43% fw. Nel gruppo sottoposto a esposizione all'estratto di bergamotto, è stata osservata una concentrazione totale di lipidi pari al 2,06% fw. Al contrario, il gruppo MIX, esposto sia a SLS che a BRG, ha mostrato valori dell'1,93% fw. L'analisi statistica ha dimostrato che non vi erano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali SLS, BRG e MIX e il gruppo di controllo ($p > 0,05$). Analizzando il profilo degli acidi grassi emerge come l'esposizione ai vari composti e al loro mix abbia determinato una variazione significativa nel contenuto. Indipendentemente dallo stato di controllo o sperimentale, la composizione di FA di *M. galloprovincialis* è risultata caratterizzata da un elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi (PUFA, 42,96-49,76%, $p < 0,05$), seguito da un livello intermedio di acidi grassi saturi (SFA, 29,67-32,80%, $p < 0,05$) e da una minore quantità di acidi grassi monoinsaturi (MUFA, 19,33-23,14%, $p < 0,05$). Gli acidi grassi più abbondanti rilevati nei tessuti molli delle cozze sono stati rispettivamente, l'acido eicosapentenoico (C20:5 ω -3, 20,25-20,96%, $p > 0,05$), l'acido palmitico (C16:0, 15,97-20,02%, $p < 0,05$), l'acido docosaesaenoico (C22:6 ω -3, 11,51-17,35%, $p < 0,05$), l'acido stearico (C18:0, 5,15-8,77%, $p < 0,05$) e l'acido palmitoleico (C16:1 ω -7, 0,16-8,64%, $p < 0,05$) (Tabella 12). L'esposizione all'SLS ha influenzato molto spesso in maniera

negativa, il metabolismo lipidico di *M. galloprovincialis*, sia rispetto al controllo che ai gruppi esposti al bergamotto o al MIX. Al contrario, molto spesso il gruppo esposto all'estratto di bergamotto, non ha mostrato significative differenze rispetto al controllo, solamente nel caso della somma dei monoinsaturi, dove addirittura il gruppo esposto al bergamotto mostrava un contenuto superiore (CTR: 19,33%, BRG: 23,14%), dato principalmente da un contributo superiore da parte dell'acido palmitoleico (C16:1 ω -9, CTR:0,10%, BRG:11,07%), dell'acido vaccenico (C18:1 ω -7, CTR: 2,64%, BRG: 3,54%), e dell'acido gondonico (C20:1 ω -9, CTR:0,61%, BRG: 2,54%). Vi è una generale diminuzione del contenuto in acidi grassi saturi nel gruppo esposto al sodio lauril sulfate (dal SLS: 29,67%, a 31,88-32,80% nel CTR, BRG e MIX), dati principalmente da una diminuzione significativa dell'acido palmitico (C16:0, 15,97-20,02%, $p < 0,05$). Il gruppo esposto al mix delle due sostanze spesso ha evidenziato valori simili a quelli del gruppo di controllo o del bergamotto, come nel caso degli acidi grassi saturi (SFA, CTR: 32,80%, BRG: 31,88%, MIX: 32,68%, $p > 0,05$).

Tabella 12: Profilo lipidico totale (% fw) e FA (% degli acidi grassi totali, fw) dei gruppi di esposizione di *M. galloprovincialis* trattati con SLS, BRG e MIX. I dati sono rappresentati come media $\pm$ SD di analisi in triplo.

Analiti (%)	Gruppi testati			
	Controllo	SLS	BRG	MIX
<i>Lipidi Totali</i>	2,21 $\pm$ 0,59 ^a	1,43 $\pm$ 0,22 ^a	2,06 $\pm$ 0,17 ^a	1,93 $\pm$ 0,18 ^a
C14:0	3,33 $\pm$ 0,44 ^a	1,03 $\pm$ 0,03 ^b	3,60 $\pm$ 0,15 ^a	3,96 $\pm$ 0,14 ^a
C15:0	0,63 $\pm$ 0,06 ^a	0,46 $\pm$ 0,10 ^a	0,62 $\pm$ 0,10 ^a	0,82 $\pm$ 0,11 ^a
C16:0	19,01 $\pm$ 0,13 ^a	15,97 $\pm$ 0,27 ^b	18,92 $\pm$ 0,37 ^a	20,02 $\pm$ 0,65 ^a
C17:0	1,25 $\pm$ 0,06 ^a	1,61 $\pm$ 0,11 ^b	1,25 $\pm$ 0,08 ^a	1,11 $\pm$ 0,60 ^a
C18:0	6,63 $\pm$ 0,73 ^a	8,77 $\pm$ 0,27 ^b	6,20 $\pm$ 0,14 ^a	5,15 $\pm$ 0,13 ^a
C20:0	1,67 $\pm$ 0,11 ^a	1,52 $\pm$ 0,15 ^{a,b}	1,03 $\pm$ 0,06 ^b	1,41 $\pm$ 0,14 ^{a,b}
Σ SFA	32,80 $\pm$ 0,44 ^a	29,67 $\pm$ 0,24 ^b	31,88 $\pm$ 0,49 ^a	32,68 $\pm$ 0,30 ^a
C 14:1	0,64 $\pm$ 0,1 ^a	0,52 $\pm$ 0,15 ^a	0,55 $\pm$ 0,17 ^a	0,76 $\pm$ 0,06 ^a
C 15:1	0,07 $\pm$ 0,01 ^a	0,08 $\pm$ 0,02 ^a	0,11 $\pm$ 0,01 ^a	0,05 $\pm$ 0,01 ^a

C16:1 ω-9	0,10 ± 0,03 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	11,07 ± 0,23 ^b	0,13 ± 0,02 ^a
C16:1 ω-7	6,17 ± 0,21 ^a	2,88 ± 0,08 ^b	0,16 ± 0,07 ^c	8,64 ± 0,31 ^d
C17:1	0,30 ± 0,03 ^a	0,30 ± 0,04 ^a	0,30 ± 0,03 ^a	0,35 ± 0,07 ^a
C18:1 ω-9	3,50 ± 0,15 ^a	4,1 ± 0,18 ^b	2,74 ± 0,13 ^b	1,84 ± 0,08 ^b
C18:1 ω-7	2,64 ± 0,13 ^a	2,52 ± 0,07 ^a	3,54 ± 0,27 ^b	3,04 ± 0,10 ^{a,b}
C20:1 ω-11	2,49 ± 0,14 ^a	3,06 ± 0,07 ^b	1,57 ± 0,08 ^{a,c}	2,20 ± 0,13 ^b
C20:1 ω-7	1,96 ± 0,12 ^a	2,08 ± 0,10 ^a	2,06 ± 0,04 ^a	2,01 ± 0,03 ^a
C20:1 ω-9	0,61 ± 0,11 ^a	3,29 ± 0,15 ^b	2,54 ± 0,38 ^b	2,74 ± 0,34 ^b
C22:1 ω-11	0,20 ± 0,03 ^a	0,43 ± 0,13 ^b	0,19 ± 0,03 ^a	0,08 ± 0,01 ^b
C22:1 ω-9	0,61 ± 0,07 ^a	0,91 ± 0,17 ^{a,c}	0,33 ± 0,03 ^{a,b}	0,13 ± 0,04 ^b
<i>Σ MUFA</i>	19,33 ± 0,34 ^a	20,29 ± 0,35 ^a	23,14 ± 0,15 ^b	22,07 ± 0,65 ^b
C18:2 ω-6	0,96 ± 0,07 ^a	0,64 ± 0,13 ^{a,b}	1,01 ± 0,02 ^{a,c}	1,19 ± 0,05 ^{a,c}
C18:3 ω-6	0,04 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a
C18:3 ω-3	1,50 ± 0,40 ^a	0,99 ± 0,04 ^{a,b}	1,95 ± 0,11 ^{a,c}	1,99 ± 0,06 ^{a,c}
C18:4 ω-3	2,76 ± 0,27 ^a	1,04 ± 0,04 ^b	3,11 ± 0,04 ^{a,c}	3,39 ± 0,09 ^c
C18:4 ω-1	0,10 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,03 ^a	0,09 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,01 ^a
C20:2 ω-6	0,25 ± 0,10 ^a	0,30 ± 0,05 ^a	0,18 ± 0,04 ^a	0,21 ± 0,03 ^a
C20:3 ω-6	0,09 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,06 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,03 ^a
C20:3 ω-3	0,14 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,06 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,04 ^a
C20:4 ω-6	3,50 ± 0,41 ^a	4,85 ± 0,24 ^b	3,01 ± 0,06 ^a	3,08 ± 0,11 ^a
C20:4 ω-3	0,23 ± 0,13 ^a	0,28 ± 0,08 ^a	0,13 ± 0,03 ^{a,b}	0,53 ± 0,08 ^{a,c}
C20:5 ω-3	20,25 ± 0,86 ^a	20,96 ± 0,23 ^a	20,30 ± 0,31 ^a	20,82 ± 1,03 ^a
C21:5 ω-3	0,85 ± 0,10 ^a	0,83 ± 0,11 ^a	0,55 ± 0,07 ^a	0,59 ± 0,07 ^a
C22:2	0,07 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a
C22:4 ω-6	0,37 ± 0,04 ^a	0,57 ± 0,06 ^{a,b}	0,32 ± 0,07 ^a	0,30 ± 0,07 ^a
C22:5 ω-6	0,47 ± 0,03 ^a	0,66 ± 0,04 ^{a,b}	0,35 ± 0,06 ^a	0,35 ± 0,08 ^a
C22:5 ω-3	0,67 ± 0,06 ^a	0,78 ± 0,10 ^a	0,30 ± 0,03 ^b	0,71 ± 0,10 ^a
C22:6 ω-3	13,70 ± 0,88 ^a	17,35 ± 0,75 ^b	11,51 ± 0,41 ^a	11,73 ± 0,30 ^a
<i>Σ PUFA</i>	45,06 ± 0,31 ^a	49,76 ± 0,42 ^b	42,96 ± 0,44 ^a	45,25 ± 0,35 ^a

$\Sigma \omega 3$	$39,25 \pm 0,39^a$	$42,34 \pm 0,56^b$	$37,87 \pm 0,68^a$	$39,85 \pm 0,57^{a,b}$
$\Sigma \omega 6$	$5,31 \pm 0,35^a$	$6,65 \pm 0,04^b$	$4,65 \pm 0,11^a$	$4,96 \pm 0,10^a$
$\omega 6/\omega 3$	$0,14 \pm 0,09^a$	$0,16 \pm 0,02^a$	$0,12 \pm 0,01^a$	$0,12 \pm 0,02^a$

a-c: le lettere con apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$, post hoc Tukey Test); le stesse lettere con apici diversi nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un parametro. Le lettere con gli apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0,05$, post hoc Tukey Test).

3.4.3.3. Proteine Totali

Il contenuto proteico totale dei pool di *M. galloprovincialis* dei gruppi di controllo e di esposizione è riportato nella Tabella 13. Il contenuto proteico medio dei mitili di controllo era pari al 20,21%, valore che è diminuito in tutti i gruppi di esposizione: SLS (18,16%), BRG (18,41%) e MIX (18,57%). L'analisi statica ha mostrato che la differenza tra le medie dei campioni di tutti i gruppi sperimentali non era abbastanza grande da essere statisticamente significativa ($p \geq 0,05$).

Tabella 13: Proteine totali (% fw) dei gruppi di controllo e trattati (cioè SLS, BRG, MIX) di *M. galloprovincialis*. I dati sono presentati come media $\pm$ SD di analisi in triplo.

	Gruppi testati			
	Controllo	SLS	BRG	MIX
Proteine totali (%)	$20,21 \pm 0,60^a$	$18,16 \pm 0,31^a$	$18,41 \pm 0,49^a$	$18,57 \pm 0,62^a$

a-c: le lettere con apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$, post hoc Tukey test); le stesse lettere con apici diversi nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un parametro. Le lettere con gli apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0,05$, post hoc Tukey test).

3.4.3.4. Carotenoidi

Il contenuto in carotenoidi in *M.galloprovincialis*, espresso come β -carotene dei gruppi di controllo e di esposizione è riportato nella Tabella 14. La media del contenuto di carotenoidi nel gruppo di controllo era pari a 5,99 mg/Kg, con una diminuzione in ogni gruppo di esposizione. In quanto nel gruppo esposto all'SLS vi era un contenuto medio di 3,70 mg/Kg, in BRG pari a 4,75 mg/Kg e il MIX è risultato essere quello con il valore medio più alto, pari a 5,44 mg/Kg. Vi è una differenza significativa solamente tra il gruppo esposto all'SLS e quello esposto al MIX ($p < 0,05$).

Tabella 14: Carotenoidi (espressa come β -carotene, mg/Kg) dei gruppi di controllo e trattati (cioè SLS, BRG, MIX) di *M.galloprovincialis*. I dati sono presentati come media $\pm$ SD di analisi in triplo.

	Gruppi testati			
	Controllo	SLS	BRG	MIX
Carotenoidi				
(β-carotene, mg/kg)	5,99 $\pm$ 0,96 ^a	3,70 $\pm$ 0,16 ^{a,b}	4,75 $\pm$ 0,83 ^a	5,44 $\pm$ 0,45 ^{a,c}

a-c: le lettere con apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$, post hoc Tukey test); le stesse lettere con apici diversi nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un parametro. Le lettere con gli apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0,05$, post hoc Tukey test).

3.4.3.5. Tocoferoli

Il contenuto in tocoferoli in *M.galloprovincialis*, espresso come vitamina E dei gruppi di controllo e di esposizione è riportato nella Tabella 15. La media del contenuto di vitamina E non è variata in maniera significativa tra i gruppi esposti alle varie sostanze e il controllo ($p > 0,05$). In quanto il CTR: 0,46 mg/Kg, SLS: 0,40 mg/Kg, BRG: 0,35 mg/Kg e il MIX: 0,48 mg/Kg.

Tabella 15: Tocoferoli (espressa come Vitamina E, mg/Kg) dei gruppi di controllo e trattati (cioè SLS, BRG, MIX) di *M.galloprovincialis*. I dati sono presentati come media $\pm$ SD di analisi in triplo.

	Gruppi testati			
	Controllo	SLS	BRG	MIX
Tocoferoli				
(Vitamina E, mg/Kg)	0,46 $\pm$ 0,10 ^a	0,40 $\pm$ 0,06 ^a	0,35 $\pm$ 0,08 ^a	0,48 $\pm$ 0,10 ^a

a-c: le lettere con apici diversi nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$, post hoc Tukey test); le stesse lettere con apici diversi nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un parametro. Le lettere con gli apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0,05$, post hoc Tukey test).

3.4.4. Discussioni

A causa degli elevati volumi di produzione e delle numerose applicazioni, l'SLS è stato ritrovato diffuso nell'ambiente acquatico e numerosi hanno dimostrato i suoi effetti negativi lungo tutta la catena trofica, fino anche all'uomo causando così effetti tossici avversi. In questo contesto, è fondamentale condurre ricerche sui composti che possono potenzialmente salvaguardare la vita acquatica, al fine di proporre l'uso di sostanze capaci di mitigare l'impatto dei contaminanti ambientali sugli organismi.

In questo studio si è dimostrato come l'uso di estratto di bergamotto, frutto dal caratteristico giallo-verdastro e dal gusto acidulo, sia in grado di contrastare gli effetti negativi dell'esposizione al SLS sul *Mytilus galloprovincialis*. Pur avendo una natura biodegradabile (Bondi et al., 2015), l'SLS è raramente monitorato e rimane non regolamentato poiché considerato "ecologico". Tuttavia, vi sono studi recenti che hanno valutato il livello di tossicità dell'SLS sia sul mitilo (Sayed & Authman, 2018; Freitas et al., 2020; Freitas et al., 2021) che su altre specie acquatiche (Asio et al., 2023).

I macronutrienti, come i lipidi e le proteine, svolgono molte funzioni vitali negli organismi acquatici. Questi composti sono utili come marcatori trofici per tracciare le relazioni predatore-preda e definire le reti alimentari nell'ambiente marino, poiché alcuni di essi, come gli acidi grassi essenziali, possono essere ottenuti solo da risorse alimentari

specifiche (De Troch et al., 2012; Kelly e Scheibling, 2012). Inoltre, i macronutrienti sono considerati ottimi biomarcatori per la salute dell'ecosistema e indicatori di stress in risposta all'esposizione a xenobiotici (Maazouzi et al., 2008; Sanchez-Muros et al., 2013; Filimonova et al., 2016). Il concetto di trasferimento conservativo degli acidi grassi attraverso le reti alimentari acquatiche e il loro utilizzo come biomarcatori è stato proposto per la prima volta nel 1935 da Lovern. Di conseguenza, le analisi dei biomarcatori di FA sono diventate uno strumento importante per risolvere le interazioni trofiche in entrambi i mari (Dalsgaard et al., 2003). La modifica dei FA ingeriti dai consumatori ha importanti implicazioni per i livelli trofici superiori, poiché la qualità dei nutrienti disponibili per i livelli trofici superiori può essere alterata o migliorata. Gli acidi grassi con 2 o più doppi legami nella catena alifatica (FA polinsaturi o PUFA) rappresentano di solito almeno un terzo di tutti i FA negli organismi in cui svolgono diversi ruoli principali. Solitamente i lipidi variano in dipendenza con la dieta e dalle condizioni ambientali in cui il mollusco si trova, i campioni del gruppo di controllo hanno mostrato un profilo lipidico totale e di FA paragonabili a quelli mostrati in precedenti lavori su muscolo dello stesso sito di raccolta (Costa et al., 2015, 2016; Porretti et al., 2023), in particolare per quanto riguarda i principali SFA, MUFA e PUFA. In ogni caso, dopo l'esposizione in laboratorio, le cozze erano caratterizzate da una riduzione dei lipidi totali che del loro profilo negli acidi grassi saturi (SFA), a seguito dell'esposizione a SLS, non vi sono cambiamenti nei monoinsaturi (MUFA) e un aumento dei poli insaturi (PUFA), rispetto al gruppo di controllo. In ragione anche con quanto espresso in altro studio condotto da Porretti et al., (2023), dove un simile profilo si è registrato a seguito dell'esposizione dei mitili al DEHT, un plastificante ampiamente diffuso nell'ambiente come inquinante. Non vi sono studi diretti che abbiano analizzato le alterazioni degli acidi grassi a seguito dell'esposizione delle cozze a surfattanti anionici (come l'SLS). Vi sono però numerosi studi che riguardano l'alterazione del profilo lipidico dei mitili esposti a contaminanti quali metalli pesanti (Fokina et al., 2013; Roma et al., 2022), petrolio (Bakhmet et al., 2021). In un lavoro di Albergamo et al., (2016), si è valutata l'alterazione del contenuto di acidi grassi nei mitili di controllo (provenienti da una zona incontaminata) e mitili esposti a diversi contaminanti (zona contaminata dalla presenza

di metalli pesanti e idrocarburi policiclici aromatici). L'esposizione a questi contaminanti ha determinato una perturbazione dei processi cellulari, portando ad una alterazione del contenuto degli acidi grassi, soprattutto nei saturi e nei poli-insaturi.

Il limonene, il componente principale dell'olio di bergamotto, ha un effetto ipolipemizzante. In precedenza, altri ricercatori hanno dimostrato che il consumo di grassi contenenti limonene nelle diete riduce il colesterolo totale, le lipoproteine a bassa densità (LDL, colesterolo cattivo) e i trigliceridi nel sangue, aumentando le lipoproteine ad alta densità (HDL, colesterolo buono) (Vieira et al., 2018; Ahmad & Beg, 2013). Nel nostro studio, si può notare che l'acido alfa-linolenico (C18:3 ω -3) è più alto sia nel gruppo trattato con BRG (1,95%) che nel mix (1,99%) rispetto al gruppo di controllo (1,50%). In ogni caso, l'uso dell'estratto di bergamotto, da solo o in combinazione con SLS, ha determinato un ristabilimento più o meno marcato dei livelli di lipidi totali e del contenuto di acidi grassi rispetto al controllo. Questo è evidente anche dal fatto che, nella maggior parte dei casi, non siano state riscontrate differenze significative rispetto al gruppo di controllo ($p > 0,05$). Un caso particolare è l'acido palmitoleico (C16:1 ω -9), che risulta nettamente superiore nel gruppo esposto all'estratto di bergamotto (CTR: 0,10; SLS: 0,04; BRG: 11,07; MIX: 0,13). Secondo de Souza et al., (2018), l'acido palmitoleico ha un potenziale antinfiammatorio sulle cellule endoteliali stimulate con TNF- α e può quindi contrastare la disfunzione endoteliale, influenzando l'aterogenesi e i processi infiammatori. L'acido stearidonico (C18:4 ω -3), un PUFA altamente insaturo, viene metabolizzato efficacemente in EPA con una bioequivalenza di $\sim 5:1$, come determinato dall'indice omega-3, un biomarcatore del rischio di malattie cardiovascolari. Gli alfa idrossi-acidi (AHA) sono altamente raccomandati attraverso il consumo di PUFA altamente insaturi (n -3), in particolare EPA e DHA, ma c'è il timore che non si riesca a raggiungere tali raccomandazioni attraverso il consumo di pesce (Whelan et al., 2012). Nel nostro studio, abbiamo osservato un netto aumento di questo acido a seguito dell'esposizione delle cozze al BRG (3,11%) e al MIX (3,39%).

L'esposizione al SLS così come al BRG e al loro MIX ha indotto una leggera diminuzione nel metabolismo delle proteine in *M. galloprovincialis*. Le cozze in condizioni fisiologiche ottimali come quelle del gruppo di controllo mostrano un contenuto superiore (20,21%)

rispetto soprattutto al gruppo trattato con SLS (18,16%). Non vi sono studi che riportino come il contenuto proteico possa variare a seguito dell'esposizione a contaminanti. Se non un nostro precedente studio, Porretti et al., (2023); dove anche in questo caso si era registrato una diminuzione delle proteine a seguito dell'esposizione al DEHT (CTR: 15,95%; DEHT1: 14,76% e DEHT100: 11,46%), un plastificante diffuso.

Uno studio di Venshinin (1996) ha esaminato il ruolo dei carotenoidi nei molluschi. I carotenoidi sono pigmenti naturali che svolgono diverse funzioni biologiche, tra cui la protezione contro l'ossidazione, la modulazione del sistema immunitario e la partecipazione alla fotosintesi nei molluschi fotosintetici, e il coinvolgimento dei carotenoidi nella sintesi anaerobica di ATP nelle cellule dei molluschi (Nagy, 1977). Secondo Petrunka (1982), il contenuto di carotenoidi è più elevato negli organi che accumulano calcio o in cui avviene un intenso trasporto transmembrana di calcio. Venshinin (1996) ha esaminato la presenza dei carotenoidi in diversi molluschi, tra cui il *Mytilus galloprovincialis*, localizzandoli principalmente nell'epatopancreas e nelle branchie. Nel nostro studio, abbiamo osservato che l'esposizione al SLS riduce il contenuto di carotenoidi (3,70 mg/kg, $p < 0,05$) rispetto al controllo (5,99 mg/kg), ma anche rispetto al gruppo trattato con BRG (4,75 mg/kg) e al MIX (5,77 mg/kg).

La vitamina E, riferita anche come α -tocoferolo, ha la funzione negli animali di principale antiossidante lipidico solubile in grado di rompere le catene di radicali liberi nelle membrane (Packer & Landvik, 1989). Il ruolo principale del tocoferolo è quello di antiossidante, in quanto protegge le strutture di membrana, gli acidi grassi essenziali e la vitamina A dall'ossidazione. I molluschi filtratori, compresi i mitili, si nutrono quasi esclusivamente di una varietà di piante marine unicellulari (Page & Ricard, 1990), che sono la fonte principale di tocoferoli. Per questo motivo, i mitili sono adatti per studiare i tocoferoli nei molluschi. È ormai risaputo che la vitamina E ha un effetto sulla riproduzione negli animali (Nelson, 1981) e che il contenuto di vitamina E dei mitili dovrebbe quindi variare in relazione al ciclo riproduttivo e stagionalmente nel corso della loro vita. Lo studio di Sigurgisladottir et al., (1993) mostra come il contenuto medio di α -tocoferolo in *M. edulis* provenienti dalla Nova Scozia sia superiore a quello rilevato nei nostri campioni di *M. galloprovincialis*. Si parla di valori tra 3 e 8 $\mu\text{g/g}$ in *M. edulis* contro i

0.35-0.48 µg/g in *M.galloprovincialis* ($p>0,05$), dovuto probabilmente alla differenze di specie, di luogo di provenienza e dalla stagione. Non sono stati trovati studi che rilevino i possibili cambiamenti nel contenuto di tocoferoli nei mitili a seguito dell'esposizione a xenobiotici.

3.4.5. Conclusioni

In conclusione, questo studio ha evidenziato gli effetti negativi dell'esposizione al SLS sulla specie sentinella *Mytilus galloprovincialis*, comprese le alterazioni dei parametri nutrizionali, come i profili degli acidi grassi, dei lipidi totali, delle proteine totali, del contenuto di carotenoidi e di tocoferoli, mai trattati fino allo stato attuale. È stato appurato che il SLS è presente nelle acque e nel biota del Mediterraneo, il che è preoccupante poiché può accumularsi negli organismi più in alto nella catena alimentare, come l'uomo. Ciò sottolinea l'urgente necessità di ridurre l'inquinamento da queste sostanze nei nostri ecosistemi acquatici e di comprendere meglio il suo impatto sulla vita marina e, in ultima analisi, sulla salute umana. Poiché i tensioattivi possono alterare il valore nutrizionale dei frutti di mare, che sono un'importante fonte di nutrienti per gli esseri umani, questo tipo di inquinamento può avere conseguenze significative per la salute umana. Inoltre, lo studio ha dimostrato il potenziale delle sostanze nutraceutiche naturali, come l'estratto di bergamotto, per ripristinare i parametri nutrizionali alterati. Saranno indubbiamente necessari ulteriori studi, anche su altre specie. E bisognerà sicuramente approfondire gli effetti sinergici di queste sostanze e le possibili nuove combinazioni.

3.5. Valutazione del *Mytilus galloprovincialis* dopo esposizione al metabolita dell'erbicida propaclor ESA

3.5.1. Premesse

Negli ultimi decenni, l'uso diffuso di vari composti chimici nella sfera agricola ha generato una preoccupazione globale per la salute ambientale. In agricoltura, l'uso intensivo e ripetuto di pesticidi e fertilizzanti è stato il modo più efficace per mantenere la produzione agricola costante per una popolazione umana ancora in crescita (Kannan et al., 2023; Wang et al., 2020; Bilal et al., 2019). Gli erbicidi rappresentano la porzione più importante dei pesticidi usati in agricoltura (Solomon et al., 2013).

Molte sostanze attive appartenenti alla famiglia dei cloroacetanilidi, vengono applicati nei campi per controllare le erbe annuali e le infestanti a foglia larga (Ma et al., 2021; Antić et al., 2015). Al giorno d'oggi, circa il 30-50% dell'inquinamento totale annuale degli ecosistemi acquatici è causato dall'uomo, proprio a causa dell'uso di pesticidi commerciali per il giardinaggio (Antić et al., 2015; Kolpin et al., 2006; Blanchoud et al., 2004). Questi erbicidi e i loro residui sono comunemente rilevati negli ecosistemi acquatici di tutto il mondo (Kiefer et al., 2021; Ma et al., 2021; Tan et al., 2020; Xu et al., 2019; Hvězdová et al., 2018; Kolpin et al., 2000, 1996), dove minacciano gli organismi viventi a diversi livelli trofici, grazie ai collegamenti della rete alimentare (Olowoyo e Mugivhisa, 2019). L'inquinamento idrico da pesticidi è influenzato da diversi fattori, principalmente l'assorbimento e la mobilità delle sostanze chimiche nel suolo, con il contenuto di materia organica del suolo che gioca così un ruolo fondamentale (Zhang et al., 2012). Tuttavia, la lisciviazione dei pesticidi nell'ambiente è un sistema complesso che dipende anche dal meccanismo di decomposizione o ossidazione dei pesticidi, dalle condizioni climatiche e dal trattamento agricolo delle colture e dei terreni (Dao et al., 2023). Negli ultimi decenni, le conoscenze sui pesticidi e dei loro metaboliti presenti nell'ambiente sono state studiate a fondo (ad esempio, Velisek et al., 2020; Hvězdová et al., 2018; Al-Mamun, 2017; Zhang et al., 2012). Tuttavia, la letteratura scientifica è ancora lacunosa per quanto riguarda il loro impatto sugli organismi non-target. La lunga

persistenza di questi prodotti agrochimici deve essere presa in considerazione, poiché essi persistono negli organismi viventi e nel loro habitat decenni dopo l'uso o dopo il divieto di utilizzo (ad esempio, Dao et al., 2023; Tresnakova et al., 2022). Dopo l'alaclor e il metolaclor, l'erbicida di pre-emergenza più utilizzato in Europa e in Cina è il propaclor [(2-cloro-N-(1-metiletil)-N-fenil-acetanilide)] (Liu et al., 2012; Lambropoulou et al., 2002; Konstantinou et al., 2000). È stato utilizzato in campo soprattutto su piantagioni di mais, sorgo, zucche, lino e fiori dal 1965 (OMS e IPCS, 1993). Le sue proprietà come il Log K_{ow} pari a 2.41 e la solubilità in acqua pari a 700 mg/L fanno sì che il propaclor si trasferisca rapidamente nell'acqua attraverso il suolo (Zhang et al., 2012; Lambropoulou et al., 2002; Clegg et al., 1991). Il suo tempo di dimezzamento è di 4 giorni, secondo Beestman e Deming (1974), e di meno di 3 giorni, secondo la U.S. Environmental Protection Agency (1998). Il ruolo cruciale nella sua biodegradazione nel suolo e nelle acque è dato dai microrganismi (Elsayed, 2015; Hatvani et al., 2013; Zhang et al., 2012; WHO e IPCS, 1993), in particolare i batteri solfato-riduttori (Stamper et al., 1997) o *Bacillus cereus* e *B. thuringiensis* (Wang et al., 2008). Questa classe di erbicidi, tra cui rientrano dinitroaniline, fosfoamidati, piridine, benzamidi, acidi benzoici, carbammati, cloroacetammidi (come l'alaclor), acetammidi, ossiacetammidi, tetrazolinoni, nitrili, benzammidi, triazolocarbossammidi e acidi chinolinici, inibiscono la divisione cellulare e interferiscono con la sintesi della membrana cellulare. Il propaclor presenta una concentrazione letale al 50% (LC50) pari a 254 µg/L (Solomon et al., 2013). Inoltre, il propaclor può essere rimosso dai sistemi biologici grazie alla formazione di coniugati glutatione-acetanilide (Stamper e Tuovinen, 1998).

Il Propaclor ESA [acido 2-Oxo-2-(N-propan-2-ilanilino) etanesolfonico] (PROP-ESA), con un peso molecolare di 257,31 g/mol, è un acido organosolfonico ed uno dei prodotti predominanti di biodegradazione dell'erbicida propaclor (National Center for Biotechnology Information, 2023; Zheng et al., 2004; WHO e IPCS, 1993). L'EPA (2023) indica che il tempo di biodegradazione del propaclor è di 4,91 giorni, l'emivita di biotrasformazione dei pesci è di 0,222 giorni, il coefficiente di adsorbimento nel suolo è pari a 123 L/kg e il fattore di bioconcentrazione è di 8,5. Non esistono dati scientifici sugli effetti negativi del PROP-ESA sugli organismi acquatici non target. Per quanto riguarda gli

erbicidi cloroacetanilidi e i loro metaboliti, Junghans et al. (2003) hanno valutato la stessa modalità d'azione di otto erbicidi, tra cui il propaclor, nelle alghe. La loro tossicità singola è risultata superiore a quella della loro miscela. D'altra parte, i prodotti biodegradabili potrebbero presentare una tossicità ancora maggiore rispetto ai prodotti chimici parentali o commerciali (Anagnostopoulou et al., 2022). L'assorbimento di pesticidi da parte dei pesci, che porta alla presenza di residui nei prodotti ittici, può avvenire come conseguenza dell'esposizione ambientale dall'acqua (EC, SANTE/10254/2021). Ciò riguarda soprattutto gli inquinanti organici persistenti derivanti dall'uso storico di pesticidi. Ad esempio, pesticidi obsoleti come le sostanze organiche persistenti clordano, DDT, dieldrin, lindano, toxafene, esaclorobenzene, mirex e bromociclo sono occasionalmente presenti nei pesci. Inoltre, alcuni pesticidi attualmente utilizzati sono stati trovati nei pesci, come il clorpirifos, il pendimetalin, il trifluralin. Oltre all'esposizione ambientale dall'acqua, è necessario prendere in considerazione anche una seconda e sempre più importante via di esposizione, ovvero l'ingestione di mangimi contenenti residui di pesticidi. L'esposizione agli erbicidi sembra possa causare diversi effetti avversi fisiopatologici, tra cui disturbi metabolici che si manifestano con alterazioni dell'attività enzimatica, alterazione delle sostanze biochimiche, lesioni istopatologiche e cambiamenti ematologici (Bojarski et al., 2018).

In laboratorio è possibile conoscere l'esatta percentuale di inquinante presente durante la fase sperimentale rendendo più facile l'identificazione degli effetti che le singole componenti hanno sulle specie test; allo stesso modo questa diversificazione è resa più difficile quando studi del genere vengono effettuati a livello ambientale dove le varie componenti delle misture sono presenti spesso in mistura con altri composti rendendo così complicato discernere tra le varie parti e identificarne in maniera dettagliata gli effetti dei singoli composti, o se i vari elementi presenti nelle acque lavorino in sinergia o in antagonismo (Dao et al., 2023; Anagnostopoulou et al., 2022; Tresnakova et al., 2022, 2021; Velisek et al., 2020). Pertanto, si è ipotizzato che il PROP-ESA possa avere effetti simili a quelli del suo composto parentale sugli organismi non bersaglio. Ad esempio, per l'alga *Scenedesmus vacuolatus* è stato riportato un valore di concentrazione efficace che produce il 50% dell'effetto massimale (EC50) pari a 35,2 µg/L e di concentrazione senza

effetti osservati (NOEC) pari a 19,9 µg/L (Junghans et al., 2003); per la specie di zooplancton *Daphnia magna* sono riportati valori di LC50 a livello di 7,8 e 6.9 mg/L e NOEC inferiore a 5,6 mg/L; il valore a 96h LC50 per la trota iridea è pari a 0,17 mg/L e la NOEC dopo 21 giorni di esposizione era di 0,019 mg/L (OMS e IPCS, 1993); e risultato inoltre leggermente tossico per gli uccelli (U.S. EPA, 1998). È stato inoltre riscontrato che il propaclor è citotossico per ratti e cellule umane (Dierickx, 1999). Tuttavia, si ritiene che la tossicità del propaclor e dei suoi metaboliti sia bassa a causa della non persistenza e della rapida riduzione ambientale (U.S. EPA, 1998). Poiché vi sono informazioni molto esigue sulla tossicità del PROP-ESA, abbiamo studiato la tossicità a lungo termine di questo composto sulla specie bivalve bioindicatrice *Mytilus galloprovincialis*. Il mitilo mediterraneo presenta diversi vantaggi nell'utilizzo per la ricerca ecotossicologica e immunologica, soprattutto grazie al suo lungo ciclo di vita, all'alimentazione a filtro, all'ampia gamma di tolleranza agli stressor ambientali e al suo legame critico nella rete alimentare (Tresnakova et al., 2023; Curpan et al., 2022; Stara et al., 2021; Tresnakova et al., 2020; Waykar e Deshmukh, 2012). Pertanto, il presente studio ha analizzato gli effetti a 10 e 20 giorni del PROP-ESA sulla specie modello *M. galloprovincialis* a livello ambientale (3,5 µg/L) e a livello multiplo (35 µg/L). In sintesi, è stato determinato il bioaccumulo di PROP-ESA e il suo effetto sulle cellule delle ghiandole digestive e sullo stress ossidativo.

L'attività di ricerca ha contribuito alla pubblicazione di un articolo su rivista indicizzata del quale si riportano le informazioni principali, figure e tabelle (Figura 18).



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

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

Fitness assessment of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 after exposure to herbicide metabolite propachlor ESA[☆]

Nikola Tresnakova^a, Federica Impellitteri^b, Sergio Famulari^c, Miriam Porretti^c, Mariacristina Filice^d, Alessia Caferro^d, Serena Savoca^e, Claudio D'Iglio^c, Sandra Imbrogno^d, Ambrogina Albergamo^e, Irene Vazzana^f, Alzbeta Stara^a, Giuseppa Di Bella^e, Josef Velisek^a, Caterina Faggio^{c,*}

^a University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Zatisi 728/II, 389 25, Vodnany, Czech Republic

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

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

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

^e Department of Biomedical, Dental and Morphological and Functional Imaging Sciences of the University of Messina, Messina, Italy

^f Zoophytoplankton Institute of Sicily, Via Gino Marinuzzi 3, 90129, Palermo, Italy

Figura 18: Tresnakova et al., 2023.

3.5.1.1. Regolamentazione sui prodotti fitosanitari

I prodotti fitosanitari, noti anche come pesticidi, sono utilizzati principalmente per mantenere le colture in buona salute e proteggerle da malattie e infestazioni. Questi prodotti includono erbicidi, fungicidi, insetticidi, acaricidi, fitoregolatori e repellenti.

Ogni prodotto fitosanitario contiene almeno una sostanza attiva, detta anche principio attivo, che consente al prodotto di svolgere la sua funzione.

Una corposa legislazione UE disciplina la commercializzazione e l'utilizzo dei prodotti fitosanitari e dei loro residui negli alimenti. I prodotti fitosanitari non possono essere commercializzati o utilizzati se non prima autorizzati. Si usa un sistema a due livelli in cui l'EFSA valuta le sostanze attive contenute nei prodotti fitosanitari e gli Stati membri valutano e autorizzano i prodotti a livello nazionale. I prodotti fitosanitari sono disciplinati essenzialmente dal Regolamento quadro (CE) 1107/2009 (Regulation (EC) No 1107/2009).

Tutte le questioni relative ai limiti di legge dei residui di pesticidi nei cibi sono trattate nel Regolamento (CE) 396/2005 (Regulation (EC) No 396/2005). Tale regolamento disciplina

anche i controlli ufficiali sui residui di pesticidi negli alimenti di origine vegetale e animale, che possono residuare dall'impiego dei pesticidi per proteggere i vegetali.

I residui di pesticidi, derivati dall'impiego di prodotti fitosanitari (PPP) in colture destinate all'alimentazione umana e animale, possono rappresentare un rischio per la salute pubblica. Secondo il regolamento (CE) n.396/2005, i livelli massimi di residui (LMR) sono i tenori massimi di residui di pesticidi ammessi per legge all'interno o sulla superficie di alimenti o mangimi. Essi vengono calcolati dopo una valutazione esaustiva delle proprietà del principio attivo e della destinazione d'uso del pesticida. I medesimi limiti di legge, stabiliti come "limiti di tolleranza", si applicano anche ai prodotti alimentari d'importazione per agevolare il commercio internazionale.

In tutte le valutazioni degli LMR condotte dall'EFSA, l'esposizione alimentare cronica (a lungo termine) e quella acuta (a breve termine) ai residui di pesticidi vengono stimate utilizzando un modello di calcolo sviluppato dall'EFSA stessa (PRIMo – Pesticide Residue Intake Model). Il modello, che si basa su dati nazionali circa i consumi di alimenti e sui pesi unitari forniti dagli Stati membri, poggia su metodologie di valutazione del rischio validate a livello internazionale.

3.5.1.2. Prodotti fitosanitari nei prodotti per la cura della persona

Gli inquinanti organici persistenti (POP), come i policlorobifenili (PCB), i composti organoclorurati e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), sono tra le cause di problemi ambientali e tra i maggiori fattori di rischio per la salute umana, proprio a causa della loro persistenza, bioaccumulazione, tossicità e capacità di trasporto (Ogunfowokan et al., 2012; Adekunle et al., 2017; Oyekunle et al., 2017). Gli IPA sono in genere presenti in natura, ma possono anche essere sintetizzati come singoli composti a seconda degli scopi, e si presentano come solidi incolori, bianchi o giallo-verdi chiaro (ATSDR, 1990), le cui proprietà cancerogene, mutagene, neurodegenerative e teratogene sono ampiamente conosciute e per cui la loro presenza nei prodotti di consumo li rende un problema di salute ambientale (EMA, 2016). La maggior parte di questi composti, vista la loro natura chimica, presentano una bassa solubilità in acqua (Nekhavambe et al., 2008), e a causa

di queste proprietà e della loro tendenza a persistere nell'ambiente sono stati inseriti negli elenchi degli inquinanti dell'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (US-EPA) e dall'Agenzia Europea per l'Ambiente (Adkonis et al., 2006). Tracce di IPA sono state trovate nell'acqua potabile, nei cosmetici, nei prodotti per la cura personale, negli additivi alimentari e nell'emissioni delle fabbriche (Martinez et al., 2004).

I pesticidi organoclorurati (OCP) sono un gruppo di composti clorurati utilizzati principalmente in agricoltura e per il controllo di parassiti. Il loro uso diffuso ne ha determinato l'ubiquità in vari ambienti e il bioaccumulo in tutta la catena alimentare. Molti composti organoclorurati sono stati vietati in molti Paesi a causa dei loro effetti mutageni e cancerogeni. Tuttavia, i loro metaboliti sono ancora presenti nell'ambiente a causa della loro persistenza e delle loro proprietà lipofile. La tossicità, il potenziale di bioaccumulo e la non biodegradabilità dei composti organoclorurati comportano rischi per la salute dell'ambiente (FAO/WHO, 1989). Quando l'uomo entra in contatto con queste sostanze, queste possono essere assorbite dal sistema umano, ridistribuite tra gli organi, metabolizzate, immagazzinate nel corpo umano o escrete. Una volta presenti nell'organismo, questi inquinanti organici persistenti possono avere un impatto negativo sui sistemi respiratorio, riproduttivo e neurologico o causare difetti alla nascita e cancro. Lo studio di Adekunle et al., 2018, ha evidenziato la scarsità di dati presenti sui livelli di IPA, OCP, e pesticidi in generale nei prodotti di consumo, tra cui cosmetici, disinfettanti e prodotti per il lavaggio, e si è focalizzato sui prodotti provenienti dalla Nigeria. Evidenziando nel suo lavoro come gli IPA fossero presenti nei gloss per le labbra, tinture, gel per capelli, detergenti viso e creme per capelli, nell'ordine che andava da 15.000 µg/g a 500 µg/g. L'alta quantità potrebbe essere dovuta dal fatto che i prodotti a base di petrolio (come petrolati, catrame) usati nella produzione di molti cosmetici costituiscono normalmente una delle principali fonti di IPA (UNECE, 2004). Il valore medio totale degli OCP presenti nei disinfettanti è stato pari a 10.56 ppm. I principali composti rilevati sono stati Endrina, Eptacoloro, Endosulfano e Metossicloro. La concentrazione più alta di OCP è stata riscontrata nei balsami (81,67 µg/mL), seguito da detergente per le mani, shampoo e sapone liquido (0,50 µg/mL). Nella maggior parte dei casi riscontrati in questo studio, la presenza degli OCP era nei prodotti di pulizia del corpo rispetto che nei

disinfettanti, dovuto probabilmente all'incorporazione di questi prodotti durante le fasi di produzione. Inoltre, I risultati della concentrazione media di OCP in disinfettanti e nei prodotti per il lavaggio erano nella maggior parte dei casi, superiori al limite fissato dalla Commissione Europea (EC, 2008). Ciò potrebbe comportare gravi implicazioni per la salute della numerosa popolazione di utilizzatori finali di questi prodotti per l'igiene personale. Si è appurato che in letteratura esistono pochi rapporti sulle concentrazioni di IPA nei prodotti per l'igiene personale. E sebbene l'uso dei OCP sia stato vietato o limitato nei Paesi avanzati, le leggi non sono state applicate con successo nei Paesi in via di sviluppo, dove la regolamentazione e l'uso delle sostanze tossiche sono oggetto di attenzione da parte delle agenzie governative competenti.

3.5.2. Materiali e Metodi

3.5.2.1. Disegno sperimentale

Il bivalve marino *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) è stato scelto come organismo modello per valutare la tossicità del metabolita erbicida propaclor ESA. I mitili in esame sono stati acquisiti da un allevamento commerciale di molluschi, FARAU SRL Frutti di Mare, sul Lago di Faro a Messina (Italia). Si tratta di un piccolo lago marino con una profondità media di 3 m e una profondità massima di 30 m. I 300 mitili con una lunghezza media di $6 \pm 0,54$ cm sono stati immediatamente trasportati all'Università di Messina e suddivisi casualmente in sei vasche da 20L con aerazione continua e di acqua di lago filtrata. L'acqua per una settimana di acclimatazione e per gli esperimenti principali è stata rinnovata tre volte a settimana (T: $22,20 \pm 0,13$ °C; pH: $7,20 \pm 0,05$; salinità $3,2 \pm 0,01$ ‰) con acqua di lago fresca filtrata, e i bivalvi sono stati tenuti in condizioni di luce naturale (16 ore di luce: 8 ore di buio). Le cozze non sono state alimentate per la presenza dei nutrienti naturalmente contenuti nell'acqua del lago. Due concentrazioni di PROP-ESA, E1 ($3,5 \mu\text{g/L}$), E2 ($35 \mu\text{g/L}$), e il gruppo di controllo (nessun trattamento di esposizione) sono stati eseguiti in doppio nel disegno sperimentale ($n = 46$ per vasca). La concentrazione ambientale testata (E1) e il suo multiplo (E2) sono state scelte in accordo con la US Environmental Protection Agency (U.S. EPA, 1998). Le

soluzioni di dosaggio di PROP-ESA (Sigma - Aldrich, USA: purezza $\geq 98.0\%$; CAS n. 947601-88-9) sono state preparate in acqua distillata. Le stesse concentrazioni sono state ridosate dopo ogni rinnovo del volume d'acqua (tre volte alla settimana). Le cozze sono state analizzate dopo 10 e 20 giorni di esposizione al composto. Al momento del campionamento, le cozze sono state selezionate in modo casuale e anestetizzate su una lastra di ghiaccio prima della dissezione.

3.5.2.2. Bioaccumulo del propaclor ESA nell'acqua e negli organismi

L'estrazione del Propaclor ESA dai tessuti di 20 cozze prelevate da ciascun gruppo sperimentale è stata eseguita raccogliendo l'intero tessuto molle di ciascuna cozza appartenenti ai tre gruppi sperimentali. La procedura di estrazione è stata eseguita considerando i metodi precedenti di Shoemaker (2002) e Stara et al. (2021). Il metanolo di grado HPLC, l'acetato di ammonio di grado ACS e l'acqua ultrapura di grado HPLC sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania). Lo standard di calibrazione è stato preparato in acqua deionizzata contenente 5 mM di acetato di ammonio. Una soluzione di acetato di ammonio 10 mM in metanolo è stata preparata aggiungendo 0.77 g di acetato di ammonio a 1 L di metanolo; l'acetato di ammonio 5 mM in metanolo è stato preparato aggiungendo 0,385 g di acetato di ammonio a 1 L di acqua deionizzata. Dopo l'omogeneizzazione di ciascun campione in pool, un'aliquota di omogenato (20 g) è stata mescolata con 25 mL di acetato di ammonio 10 mM in metanolo e agitata per 30 minuti a 35 °C. La miscela ottenuta è stata centrifugata per 3 minuti a 4200 rpm. Quindi, la fase superiore è stata decantata, evaporata a 0,5 mL con un rotavapor (Büchi Heating Bath B-490, Büchi Labortechnik AG, Svizzera) e disciolta in 30 mL di acqua ultrapura. Gli estratti sono stati purificati con cartucce di carbone ENVI-CARB (6 mL, 0,5 g, Supelco). Le cartucce sono state precedentemente condizionate con 20 mL di acetato di ammonio 10 mM in metanolo e 30 mL di acqua deionizzata. I campioni di acqua sono stati fatti passare attraverso le cartucce a una velocità di flusso di 10 mL/min. Quindi le cartucce sono state lavate con 5 mL di acqua deionizzata e asciugate per 3 minuti. L'analita target è stato eluito dalle cartucce con 15 mL di acetato di ammonio 10 mM in metanolo. Tutti gli estratti sono stati evaporati a secco e, prima dell'analisi, ricostituiti a 1 mL con acetato di

ammonio 5 mM preparato in acqua deionizzata. Così come per i tessuti, è stata eseguita l'analisi delle acque di stabulazione per determinare la concentrazione nominale del composto chimico in esame.

I campioni d'acqua di ogni vasca sono stati raccolti prima e dopo ogni scambio d'acqua da ogni vasca e conservati a - 20 °C fino alla successiva analisi (Andreu-Sánchez et al., 2012). L'estrazione di PROP-ESA dai campioni d'acqua è stata effettuata secondo il metodo di Shoemaker (2002). In breve, i campioni d'acqua sono stati estratti con cartucce di carbone ENVI-CARB (6 mL, 0,5 g). I campioni sono stati dechlorati con cloruro di ammonio, 100 mg/L. Le cartucce sono state precedentemente condizionate con 20 mL di acetato di ammonio 10 mM in metanolo e 30 mL di acqua deionizzata. I campioni di acqua sono stati fatti passare attraverso le cartucce a una velocità di flusso di 10 mL/min. Quindi, le cartucce sono state lavate con 5 mL di acqua deionizzata e asciugate per 3 minuti. L'analita target è stato eluito dalle cartucce con 15 mL di acetato di ammonio 10 mM in metanolo. Gli estratti sono stati evaporati a secco e ricostituiti a 1 mL con acetato di ammonio 5 mM preparato in acqua deionizzata. Un bianco è stato preparato utilizzando gli stessi reagenti e lo stesso metodo in assenza del contaminante.

L'analisi HPLC-ESI-MS/MS è stata eseguita su un'apparecchiatura LC (sistema Prominence UFLC XR, Shimadzu, Kyoto, Giappone) composta da un controllore (CBM-20 A), pompe binarie (LC-20AD-XR), degasatore (DGU20A3 R), forno per colonne (CTO-20AC) e autocampionatore (SIL-20 A XR). Per separare l'analita target è stata utilizzata una colonna Agilent Hypersil C18 (2,1 × 100 mm, 5 µm) con una velocità di flusso di 0,4 mL/min e una temperatura della colonna di 35 °C. Il volume di iniezione utilizzato è stato di 100 µL. La composizione del gradiente della fase mobile binaria è stata (A) acetato di ammonio 10 mM e (B) metanolo. Il programma del gradiente era: 0-8 min, 10-20% di B, 8-12 min, 20-25% di B, 12-17 min 25% di B, compresi i passaggi finali di lavaggio e riequilibrio della colonna. Una sorgente di ionizzazione electrospray (ESI) ha interfacciato il sistema LC con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (LCMS-8040, Shimadzu, Kyoto, Giappone) ed è stata utilizzata in modalità di ionizzazione positiva. Lo ione precursore $[M-H]^+$ è stato dapprima sottoposto a scansione completa nell'intervallo m/z 100-500. Quindi, sono stati eseguiti esperimenti di monitoraggio di reazione selezionato

(SRM) MS/MS selezionando lo ione precursore $[MH]^+$ (m/z 258) con il primo analizzatore di massa a quadrupolo (Q1) e impostando il terzo analizzatore di massa a quadrupolo (Q3) per la scansione sequenziale degli ioni prodotto m/z 216, 217 e 258 (Tabella 16). I dati sono stati acquisiti con il software LabSolution (v 5.53 SP2, Shimadzu, Kyoto, Giappone). Per ogni pool di mitili e campione d'acqua sono state effettuate misurazioni in triplo.

Tabella 16: Tempo di ritenzione (R_t), peso molecolare, ione precursore e ioni prodotti dell'analita target erbicida metabolita del propaclor ESA (PROP-ESA).

Analita	Tempo di ritenzione, min	Peso molecolare	Ione precursore (m/z)	Ioni prodotti (m/z)
Propachlor ESA	6,3	257,31	258	216; 217; 258

3.5.2.3. Fattore di bioconcentrazione

Il bioaccumulo degli inquinanti nell'organismo acquatico è generalmente indicato attraverso il fattore di bioconcentrazione (BCF), che identifica rapporto tra le concentrazioni di inquinanti nell'organismo acquatico e nell'acqua (Arnot e Gobas, 2006). e l'acqua (Arnot e Gobas, 2006; Costanza et al., 2012). Il BCF viene misurato in condizioni controllate di laboratorio ed è espresso come un rapporto tra le concentrazioni di inquinanti chimici nell'organismo acquatico e nell'acqua in condizioni di stato stazionario (Davies e Dobbs, 1984). Il BCF è dato dalla seguente formula:

$$BCF = \frac{C_{\text{tessuto}}}{C_{\text{acqua-totale}}}$$

dove BCF è il fattore di bioconcentrazione, C_{tessuto} è la concentrazione di Propaclor nei tessuti molli dei mitili e $C_{\text{acqua-totale}}$ è la concentrazione misurata nell'acqua.

3.5.2.4. Vitalità cellulare e analisi della Ghiandola Digestiva

Per l'analisi della vitalità cellulare su emolinfa e isolamento cellule della ghiandola digestiva, e regolazione del volume cellulare si rimanda alle metodiche descritte nei paragrafi 3.1.2.6. e 3.1.2.7.

3.5.2.5. Profilo biochimico dell'emolinfa

Il profilo biochimico e la variazione degli elettroliti sono stati effettuati seguendo il metodo presentato da Stara et al. (2020a,b). Sono stati indagati calcio (Ca^{2+}), sodio (Na^+), potassio (K^+), cloruro (Cl^-), fosforo (PHOS), magnesio (Mn^{2+}) e i parametri biochimici (lattato deidrogenasi (LDH), glucosio (GLU), aspartato transaminasi (AST), alanina transaminasi (ALT), creatina chinasi (CK).

3.5.2.6. Valutazione dei biomarker di stress ossidativo e perossidazione lipidica

Per l'analisi dei biomarker e di stress ossidativo e di perossidazione lipidica si rimanda alle metodiche descritte nel paragrafo 3.1.2.8.

3.5.2.7. Indici di condizione istopatologica

Gli indici istopatologici semi-quantitativi (I_h) sono stati stimati per ogni esemplare di *M. galloprovincialis*, per valutare gli effetti della somministrazione di Propaclor,

$$I_h = \frac{\sum_1^j w_j a_{jh}}{\sum_1^j M_j}$$

secondo Bernet et al. (1999), con opportune modifiche per i bivalvi (Pagano et al., 2022a, b; Costa et al., 2013). Questo approccio prevede l'assegnazione di un valore a ciascuna alterazione istologica, in base alla rilevanza biologica, con un valore variabile tra 1 e 3 (massima gravità). Inoltre, viene attribuito un punteggio simile, con valori compresi tra 0 (nessun segno di alterazione) e 6 (alterazione diffusa). Per stimare gli indici di condizione istopatologica è stata utilizzata la seguente formula.

Dove I_h è l'indice di condizione istopatologica per l'individuo h ; w_j il valore della j_{th} alterazione istopatologica; a_{jh} è il punteggio attribuito all'individuo h per la j_{th} alterazione e M_j è il valore massimo attribuibile per la j_{th} alterazione (cioè, valore x punteggio massimo). Nell'equazione data, il denominatore normalizza I_h a un valore compreso tra 0 e 1, consentendo un confronto tra organi distinti. Gli indici relativi alle branchie e alle ghiandole digestive sono stati così stimati e suddivisi per “modelli di reazione” (alterazioni epiteliali cellulari e morfologiche). Nelle osservazioni effettuate al microscopio ottico, è stato stabilito un peso per ogni alterazione istopatologica, supportato da dati precedentemente riportati relativi all'istopatologia degli invertebrati (Costa et al., 2013) e dei vertebrati (Costa et al., 2013, 2011; Bernet et al., 1999). In base alla letteratura, l'infiltrazione di emociti ha un peso più basso ($w=1$) insieme aggregati intracellulari di melanina/aggregati simil-lipofusina, seguiti da iperplasia delle cellule epiteliali ($w = 2$) e necrosi ($w = 3$) sia per le branchie che per le ghiandole digestive.

3.5.2.8. *Analisi Statistica*

La vitalità cellulare, il test Regolazione del volume cellulare e il bioaccumulo sono stati valutati mediante ANOVA ad una via, confrontando il gruppo di controllo con i gruppi sperimentali. I parametri del profilo biochimico dell'emolinfa, l'analisi dello stress ossidativo e gli indici istopatologici (I_h) sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie. I test sono stati seguiti dal Tukey post hoc per le analisi comparative multiple con un livello di significatività di $p < 0.05$ è stato accettato come significativo. Le analisi statistiche sono state valutate con il software Graphpad Prism, versione 5 (Graphpad Software Ltd., USA, 2003). I risultati sono riportati come media $\pm$ deviazione standard (S.D.).

3.5.3. Risultati

3.5.3.1. Concentrazione bioaccumulata del propaclor ESA

La sensibilità del metodo è stata valutata determinando il limite di rilevazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) per il PROP-ESA. Il LOD medio per i campioni di acqua e tessuti molli era di 0,04 ng/g, mentre il LOQ era di 0,13 ng/g. Le concentrazioni di PROP-ESA nell'acqua sono state >80% della concentrazione nominale per tutto il periodo di esposizione, con una media dell'84%. L'acqua del lago proveniente dalla vasca di controllo era priva di PROP-ESA, i dettagli delle concentrazioni sono riportate nella seguente Tabella 17.

Tabella 17: Concentrazione del Propaclor ESA nell'acqua di lago durante la fase sperimentale e nel tessuto di *Mytilus galloprovincialis* esposto a E1 (3,5 µg/L) ed E2 (35 µg/L) dopo 10 (T1) e 20 (T2) giorni.

	Tempo di esposizione (giorni)	Gruppi sperimentali		
		Controllo (0 µg /L)	E1 (3,5 µg /L)	E2 (35 µg/L)
Acqua (µg/L)	T1 (10)	< LOD ^a	2,87 ± 0,15 ^b	29,31 ± 0,20 ^c
	T2 (20)	< LOD ^a	2,92 ± 0,18 ^b	30,97 ± 0,23 ^c
Tessuto (ng/g)	T1 (10)	< LOD ^a	7,427 ± 0,027 ^b	185,52 ± 0,134 ^c
	T2 (20)	< LOD ^a	8,147 ± 0,018 ^b	191,91 ± 0,745 ^c
BCF	T1 (10)	0	2,12	2,30
	T2 (20)	0	5,30	5,48

LOD: 0.04 ng/g e LOQ: 0.132 ng/g. I dati sono presentati come media ± S.D. I campioni d'acqua (n = 12) di ciascun gruppo sperimentale sono stati raccolti prima e dopo ogni cambio d'acqua. I tessuti molli dei gruppi sperimentali delle cozze (n = 6) è stato prelevato dopo 10 e 20 giorni di esposizione. a-b indicano una significatività di p < 0,05, in relazione alla stessa concentrazione allo stesso tempo.

3.5.3.2. Fattore di bioconcentrazione

Il fattore di bioconcentrazione (BCF) è stata calcolata dalle concentrazioni analitiche verificate nei campioni di acqua e del tessuto delle cozze (Tabella 16) dopo i primi 10 giorni (T1) di esposizione-E1: 2,12; E2: 2,30; e alla fine della fase sperimentale (20 giorni, T2) -E1: 5,30; E2: 5,48.

3.5.3.3. Profilo biochimico e vitalità cellulare dell'emolinfa

Tra gli indici del profilo biochimico dell'emolinfa non sono state rilevate differenze significative ($p>0,05$) per tutti i gruppi sperimentali (PROP-ESA-free, E1, E2) in entrambi i tempi di esposizione (T1, T2). I valori dettagliati dei singoli elettroliti e dei parametri biochimici ottenuti in questo studio sono riportati nella Tabella 18. Le analisi statistiche ($p>0,05$) hanno confermato l'assenza di effetti del PROP-ESA sulla vitalità degli emociti calcolata in base ai saggi TB e NR per tutti i gruppi sperimentali (Controllo, E1, E2) in entrambi i tempi di esposizione (T1, T2) (Tabella 19).

Tabella 18: Caratteristiche biochimiche dell'emolinfa di *Mytilus galloprovincialis* trattato con propaclor ESA ai livelli di 3,5 µg/L (E1) e 35 µg/L (E2) dopo una durata di 10 (T1) e 20 giorni (T2).

Parametri	Tempo di esposizione (giorni)	Gruppi sperimentali		
		Controllo (0 mg/L)	PRL1 (3.5 µg/L)	PRL2 (35 µg/L)
GOT/AST (U/L)	10 Giorni	1,5 ± 2,12	0 ± 0	2 ± 1
	20 Giorni	7,5 ± 7,78	7 ± 4,24	15,5 ± 13,44
GPT/ALT (U/L)	10 Giorni	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	20 Giorni	1,5 ± 2,12	1 ± 1,41	4 ± 4,24
LDH IFFC (U/L)	10 Giorni	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	20 Giorni	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
CK* (U/L)	10 Giorni	2 ± 0	2,5 ± 2,12	1 ± 1
	20 Giorni	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Glucosio (mg/dL)	10 Giorni	7,05 ± 1,34	1,6 ± 0	5,1 ± 0,1
	20 Giorni	6,85 ± 1,20	6,5 ± 0,28	7,85 ± 0,07
ISE Cl ⁻ (mmol/L)	10 Giorni	464,9 ± 4,2	467,55 ± 10,11	458,3 ± 4,6
	20 Giorni	415,7 ± 46,95	465 ± 0,07	467,7 ± 5,94
ISE K ⁺ (mmol/L)	10 Giorni	14,7 ± 0	13,55 ± 1,06	14,4 ± 0
	20 Giorni	12,2 ± 2,12	13,95 ± 0,21	14,3 ± 0,42
ISE Na ⁺ (mmol/L)	10 Giorni	495,5 ± 2,12	484 ± 26,87	522,5 ± 2,5
	20 Giorni	453 ± 52,33	489 ± 4,24	499 ± 0
Ca ²⁺ (mmol/L)	10 Giorni	10,44 ± 0,01	11,10 ± 0,05	10,77 ± 0,03
	20 Giorni	9,95 ± 1,07	10,96 ± 0,11	10,88 ± 0,07
S-Fosforo (mg/dL)	10 Giorni	1,1 ± 0,0	0,85 ± 0,35	0,8 ± 0
	20 Giorni	0,85 ± 0,21	0,7 ± 0	0,75 ± 0,07
Mn ²⁺ (mg/dL)	10 Giorni	11,55 ± 0,21	11,75 ± 0,07	11,7 ± 0
	20 Giorni	11,65 ± 0,07	11,5 ± 0,42	11,75 ± 0,07

I valori sono espressi come la media ± S.D. AST: aspartato transaminasi; ALT: alanina transaminasi; CK: creatina chinasi; GLU: glucosio; ISE; ions selective electrodes; PHOS: fosforo.

Tabella 19: Vitalità delle cellule emocitarie di *Mytilus galloprovincialis* con il metodo dell'esclusione Trypan Blue (TB) e saggio di ritenzione del Rosso Neutro (RN).

Colorazione	Tempo di esposizione (giorni)	Gruppi sperimentali		
		Controllo (0mg/L)	PRL1 (3.5 µg/L)	PRL2 (35.5 µg/L)
TB	10 Giorni	97,47 ± 1,82	91,03 ± 4,33	95,07 ± 3,46
	20 Giorni	98,8 ± 1,53	96,26 ± 2,23	95,68 ± 1,77
RN	10 Giorni	96,42 ± 0,84	96,31 ± 2,34	95,74 ± 1,39
	20 Giorni	97,67 ± 3,27	96,41 ± 2,92	94,32 ± 6,23

I valori sono espressi come la media ± S.D.

3.5.3.4. Diminuzione della Regolazione del Volume cellulare

Le analisi condotte sulle cellule della GD per valutare la capacità di RVD dopo un'esposizione in una soluzione ipotonica hanno mostrato che dopo T1, il rigonfiamento massimo raggiunto dalle cellule era dell'86% in E1 e dell'83% in E2 (Figura 19 A). In entrambi i casi, le cellule non sono tornate al loro volume originale. Tuttavia, rispetto alle cellule del gruppo di controllo, l'ANOVA a una via ha evidenziato una significatività solo per le cellule del gruppo E2 ($p < 0,5$). Al T2, le cellule hanno raggiunto più velocemente il massimo rigonfiamento rispetto al T1 con una percentuale di rigonfiamento rispettivamente dell'83% (E1) e dell'89% (E2) (Figura 19 B). Inoltre, in questo caso, le cellule non sono state riportate al volume iniziale. Tuttavia, i dati non erano statisticamente non significativi ($p > 0,05$) rispetto al controllo in entrambi i gruppi di esposizione. gruppi di esposizione.

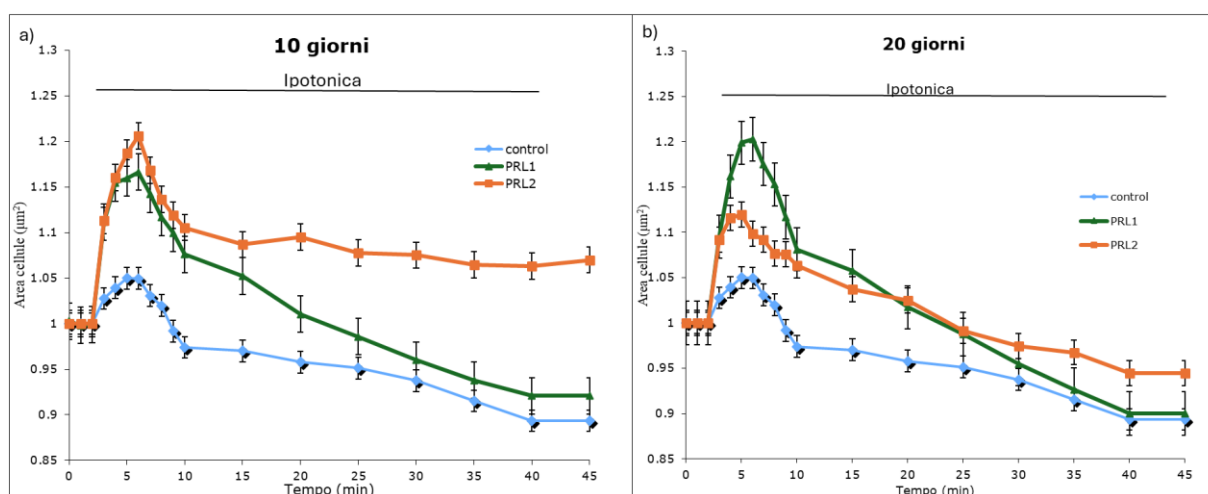


Figura 19: Diminuzione del volume di regolazione (RVD) delle cellule della ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* dopo 10 giorni (A) e 20 giorni (B) di esposizione al metabolita erbicida propaclor ESA (PROP-ESA). I rombi rappresentano il controllo; i triangoli rappresentano l'E1 (3.5 µg/L); i quadrati rappresentano l'E2 (35 µg/L). È stata applicata l'ANOVA a due vie per confrontare il gruppo testato con il controllo. Il valore rappresenta la media $\pm$ SD.

3.5.3.5. Stress ossidativo

Nelle branchie, l'attività enzimatica della SOD è rimasta inalterata ($p > 0,05$) sia nel trattamento E1 che E2 dopo il T1 (Figura 20). Tuttavia, rispetto al gruppo di controllo, dopo il T2 è stato misurato un aumento significativo ($p < 0,05$) dell'attività enzimatica nelle branchie dei mitili esposti a entrambe le concentrazioni E1 ed E2 (Figura 20). Non sono state osservate differenze significative ($p > 0,05$) nella GD a entrambe le concentrazioni dopo T1 e T2 (Figura 21). I livelli di TBARS sia nelle branchie che nella GD dei mitili sono aumentati dopo T1 nel gruppo E2. Un aumento dei livelli di TBARS è stato osservato anche dopo venti giorni di esposizione alla concentrazione più bassa (E1), sebbene con differenze significative ($p < 0,05$) solo nel tessuto della GD (Figura 20 e 21). Nelle branchie, dopo T1 sono stati rilevati alti livelli di derivati aldeidici dell'OMP nel gruppo E2, mentre i derivati chetonici sono aumentati significativamente in tutte le condizioni testate (Figura 20 e 21). Non ci sono stati cambiamenti ($p > 0,05$) in derivati aldeidici e/o chetonici nel tessuto di GD (Figura 21).

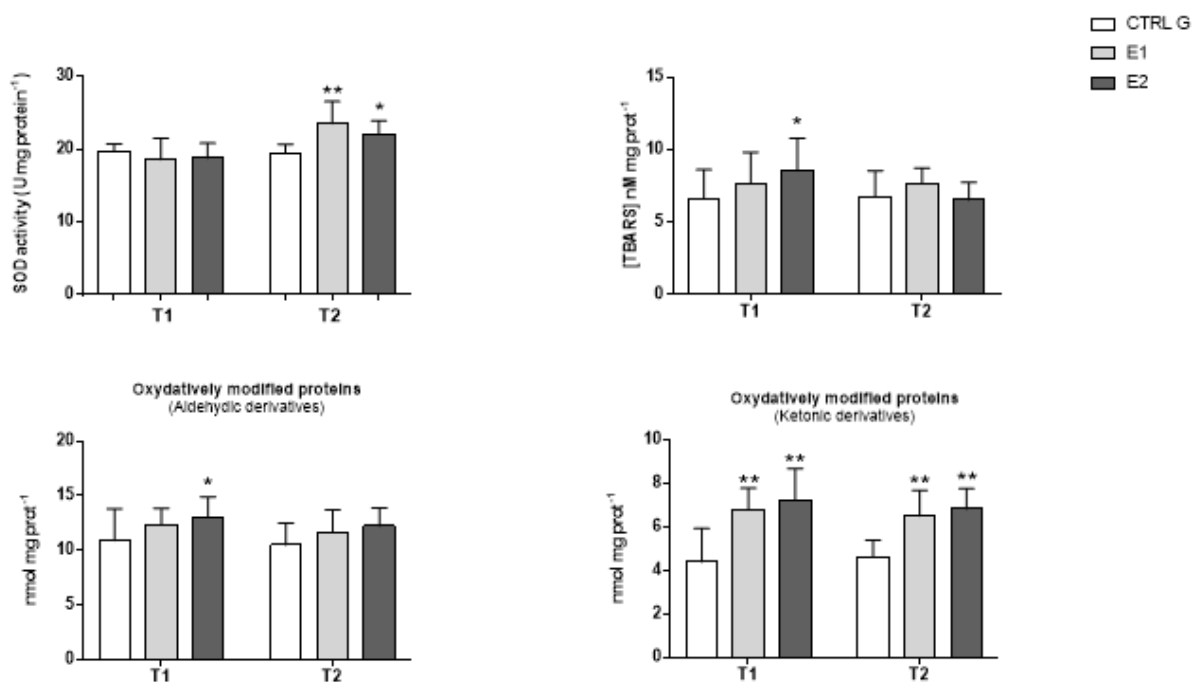


Figura 20: Effetti del trattamento con propaclor ESA sui biomarcatori dello stress ossidativo. Livelli di attività SOD, TBARS e OMP nelle branchie di mitili di controllo e trattati con propaclor ESA a diversi tempi di esposizione (T1: 10 giorni; T2: 20 giorni). I dati sono espressi come media $\pm$ s.e.m. (n=6). La statistica è stata valutata mediante ANOVA a due vie seguita dal test di confronto multiplo di Tukey (*: CTRL vs E1 o E2; *p < 0.05; **p < 0.01).

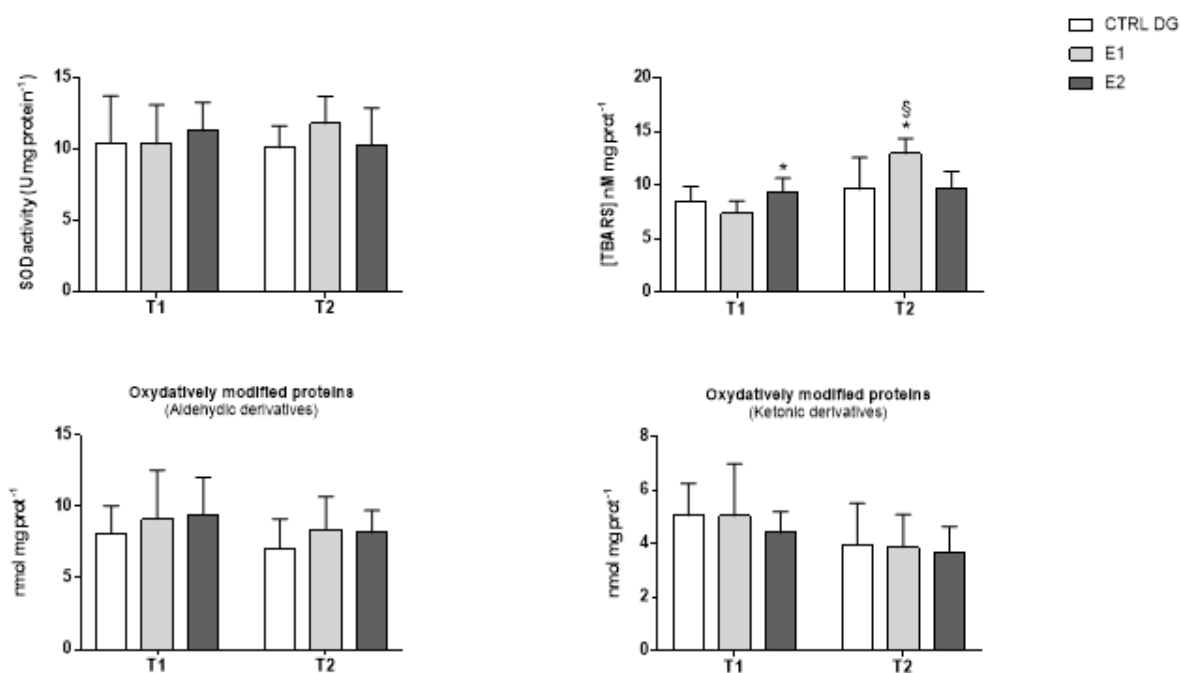


Figura 21: Effetti del trattamento con propaclor ESA sui biomarcatori dello stress ossidativo. Livelli di attività SOD, TBARS e OMP nella ghiandola digestiva di mitili di controllo e trattati con propaclor ESA a diversi tempi di esposizione (T1: 10 giorni; T2: 20 giorni). I dati sono espressi come media $\pm$ s.e.m. dei valori assoluti dei singoli esperimenti (n. 6 per ogni test). La statistica è stata valutata mediante ANOVA a due vie seguita dal test di confronto multiplo di Tukey (*: CTRL vs E1 o E2; *p < 0,05; **p < 0,01; §: E1 vs E2; §p < 0,05).

3.5.3.5. Modifiche istologiche

La valutazione istopatologica ha rivelato lesioni significative dei tessuti analizzati, emerse dal confronto con i campioni prelevati dalle vasche di controllo. In particolare, dopo il T2 sono state riscontrate risposte acute e diversi danni, soprattutto nelle branchie di *M. galloprovincialis* di E1 ed E2, con moderate differenze tra i due gruppi sperimentali (Figura 22). Tra le reazioni documentate nei tessuti branchiali, deformazioni lamellari e alterazioni epiteliali sono state le più frequenti, insieme all'infiltrazione di emociti come segno di possibili diapedesi causata dall'infiammazione. Un aumento significativo ($p < 0,05$) della vacuolizzazione è stato osservato nei mitili di E2 rispetto a quelli raccolti da E1 dopo T2. Altre risposte istologiche documentate sono state la presenza di granulociti e

aggregati di lipofuscina, sovrapproduzione di muco e perdita di ciglia, caratterizzata da una tendenza crescente per i campioni di controllo.

Per quanto riguarda i tessuti di GD analizzati, i modelli di reazione sono stati meno gravi, tranne che per l'infiltrazione di emociti, che ha mostrato una tendenza all'aumento come quella osservata nelle branchie (Figura 23). Anche in questo caso è stato documentato il deposito di lipofuscina, insieme a cambiamenti del tessuto intertubulare e altre alterazioni dei tubuli. Non sono stati notati segni di necrosi o presenza di aggregati di melanina. Secondo i risultati dell'indice di condizione istopatologica (Tabella 20), la tendenza generale delle risposte dei tessuti all'infiammazione è apparsa dipendente dal tempo e dalla dose. Tutte queste deduzioni sono state supportate dall'analisi statistica condotta sui risultati sopra citati. L'analisi della varianza è stata eseguita preliminarmente sull' I_h dei gruppi di controllo per garantire l'accuratezza dei risultati statistici ottenuti nelle analisi successive, non avendo mostrato alcuna significatività ($p > 0,05$) tra i campioni testati. Il confronto tra i gruppi sperimentali e i controlli ha rivelato una stretta correlazione tra i pattern di reazione, il tempo di esposizione e la concentrazione di PROP-ESA in entrambi gli organi analizzati. Come mostrato in Figura 24, nei tessuti delle branchie è stato osservato una significativa tendenza crescente di I_h ($p < 0,001$), strettamente correlato all'aumento della concentrazione di PROP-ESA (E1 ed E2) e ai tempi di esposizione (T1 e T2). Analogamente, la tendenza all'aumento di I_h osservata nella GD era dipendente dal tempo, come emerso dal confronto tra esemplari dello stesso gruppo sperimentale. Sono state confrontate le alterazioni del tubulo digerente (TA) e le alterazioni del tessuto intertubulare (ITC), mostrando differenze rilevanti tra gli individui esposti a entrambe le concentrazioni di PROP-ESA, con un aumento significativo dei valori di I_h osservato tra T1 e T2 (Figura 24). Inoltre, sono state notate altre differenze considerevoli legate a entrambe le concentrazioni di PRL tra i valori di I_h dell'ITC osservati dopo il T1 ($p < 0,01$).

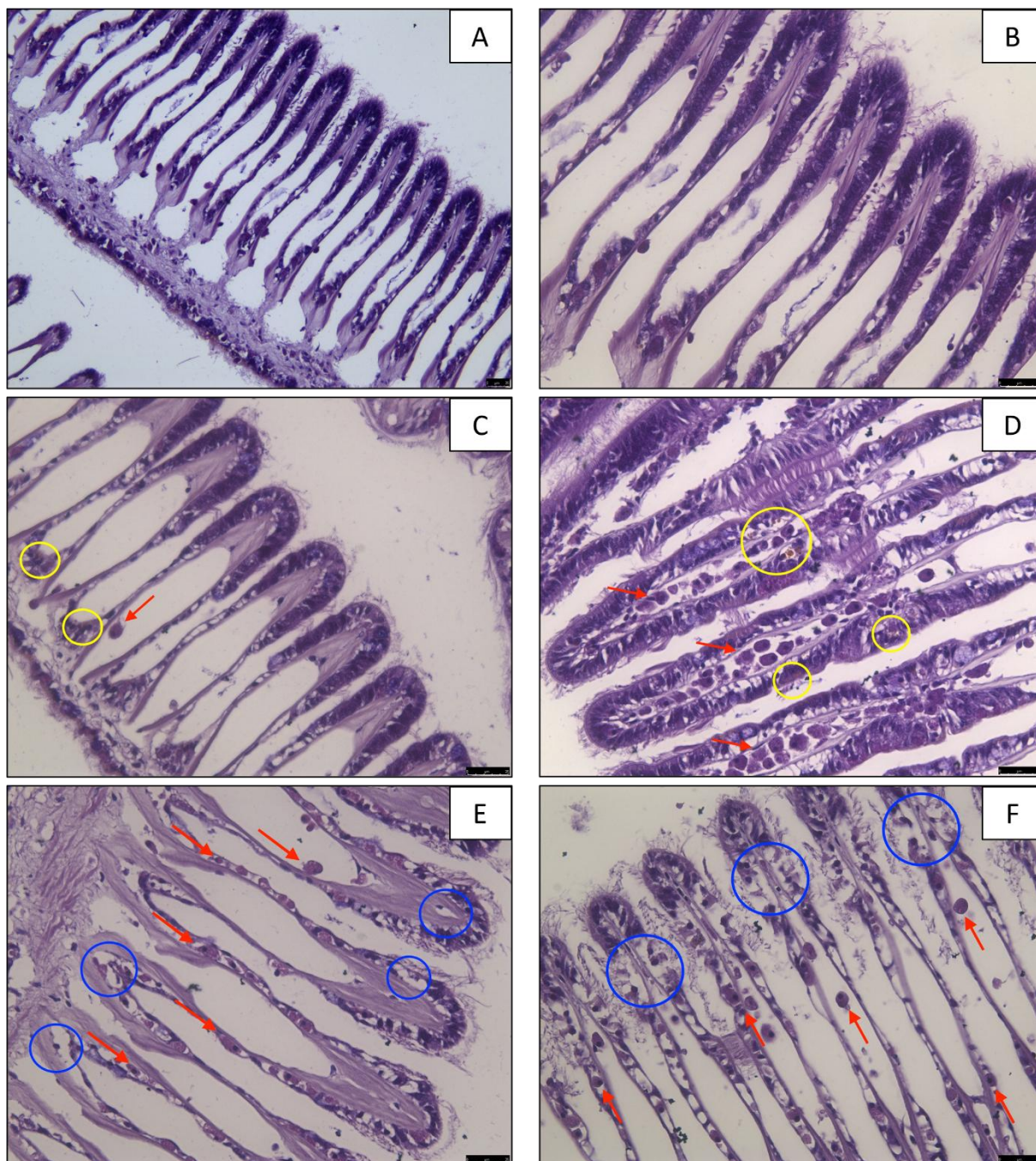


Figura 22: Tessuti branchiali di *Mytilus galloprovincialis* colorati con ematossilina ed eosina, osservati al microscopio ottico: mitili provenienti da vasche di controllo 20 × (A) e 40 × (B) - Barre di scala: 25 µm; esemplari esposti a 3. 5 µg/L (C) e a 35 µg/L (D) di propaclar ESA dopo 10 giorni di esposizione (40 ×) - Barre di scala: 25 µm; esemplari esposti a 3,5 µg/L (E) e a 35 µg/L (F) di propaclar ESA dopo 20 giorni di esposizione (100 ×) - Barre di scala: 25 µm. Le frecce rosse indicano l'infiltrazione di emociti, i cerchi gialli gli aggregati di lipofuscina e i cerchi blu le alterazioni epiteliali.

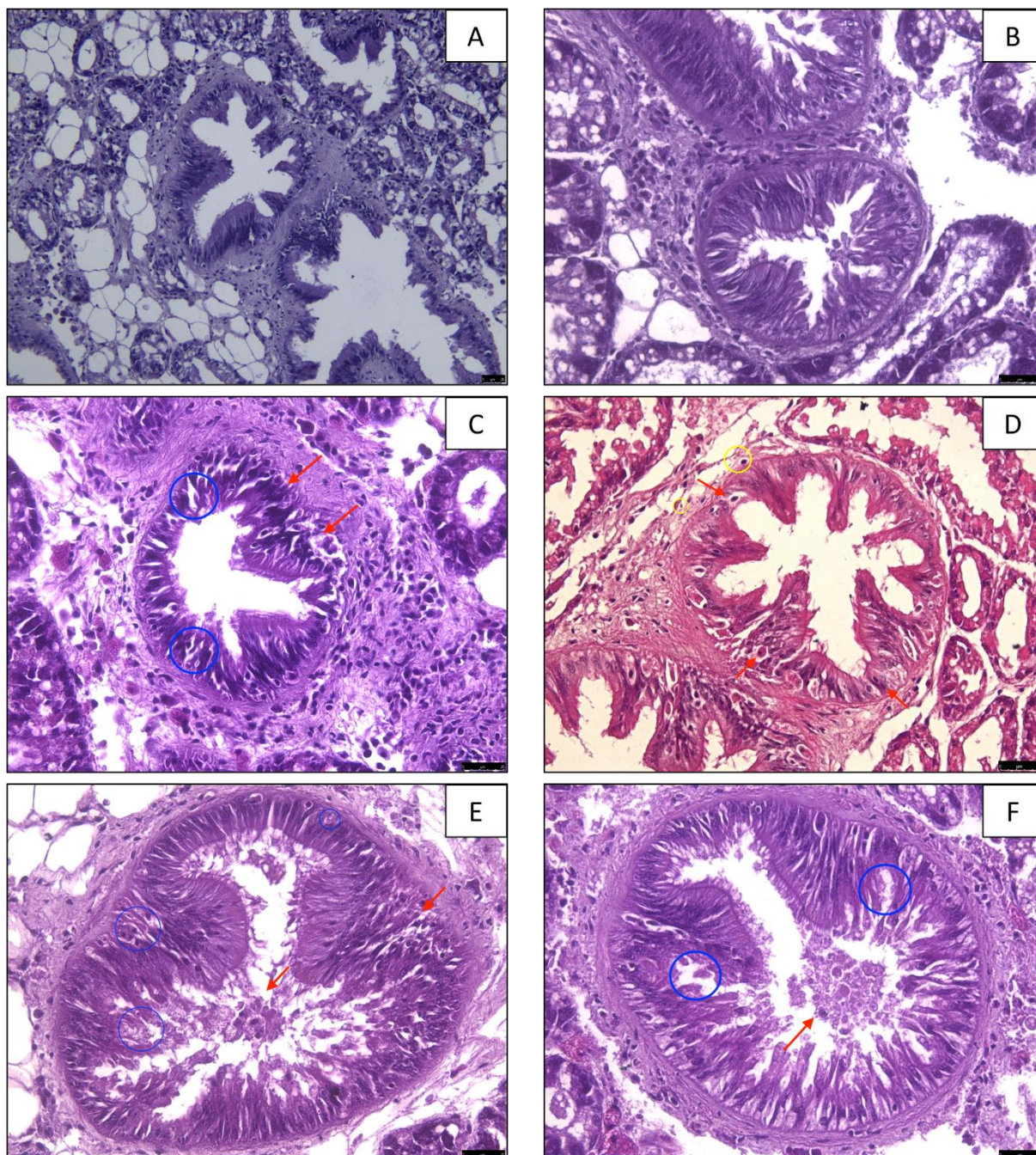
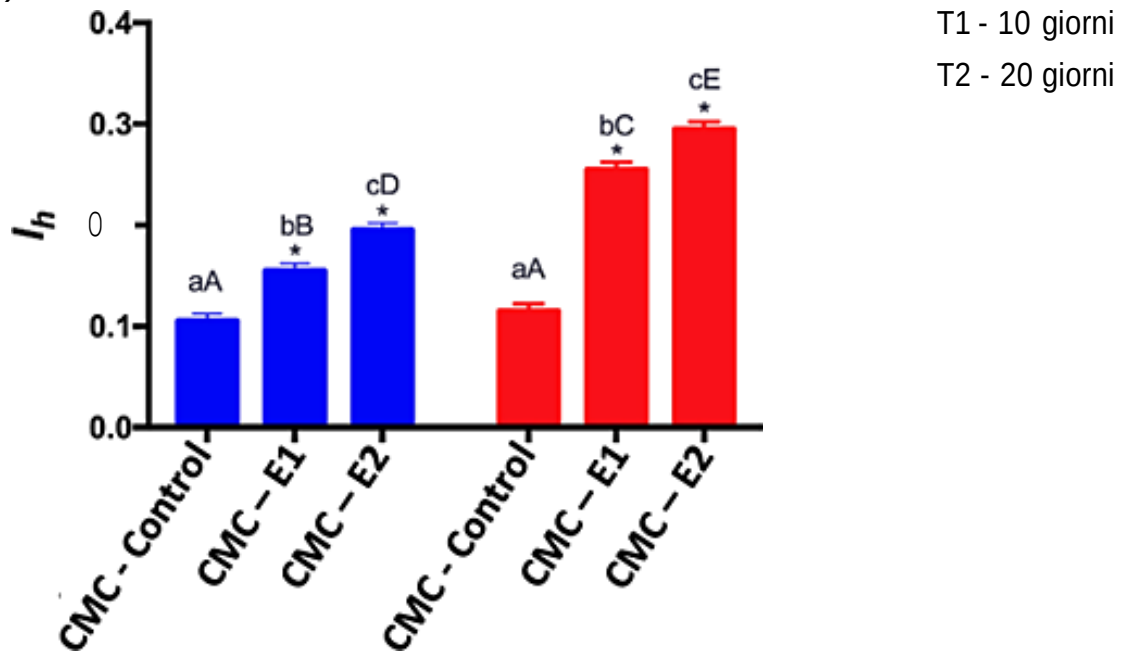


Figura 23: Tessuti delle ghiandole digestive di *Mytilus galloprovincialis* colorati con ematossilina ed eosina, osservati al microscopio ottico: mitili provenienti da vasche di controllo 20 × (A) e 40 × (B) - Barre di scala: 25 µm; esemplari esposti a 3.5 µg/L (C) e a 35 µg/L (D) di propaclor ESA dopo 10 giorni di esposizione (40 ×) - Barre di scala: 25 µm; esemplari esposti a 3,5 µg/L (E) e a 35 µg/L (F) di propaclor ESA dopo 20 giorni di esposizione (100 ×) - Barre di scala: 25 µm. Le frecce rosse indicano l'infiltrazione di emociti, i cerchi gialli gli aggregati di lipofuscina e i cerchi blu le alterazioni epiteliali. (Per l'interpretazione dei riferimenti ai colori nella legenda di questa figura, si rimanda il lettore alla versione web di questo articolo).

A)



B)

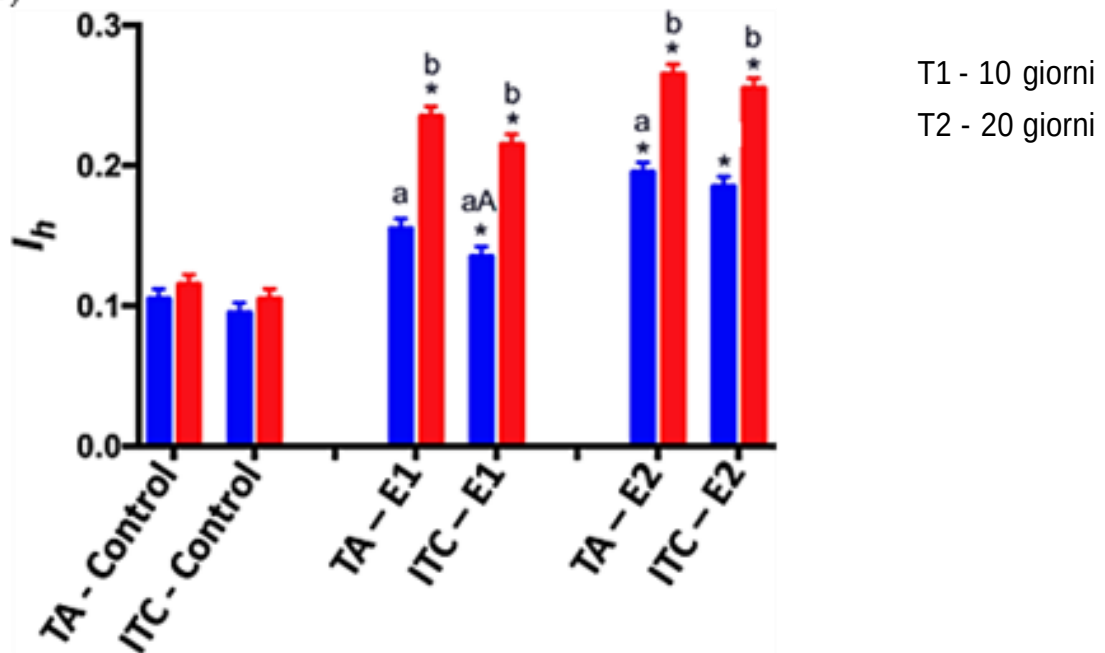


Figura 24: Valori dell'indice di condizione istopatologica (I_h) dei tessuti di *Mytilus galloprovincialis* esposti a diverse concentrazioni di Propaclor ESA (E1 ed E2) per 10 e 20 giorni (T1 e T2): branchie (A) e ghiandole digestive (B). Tutti i valori sono mostrati come media $\pm$ S.D. ($n = 4$); gli asterischi rappresentano differenze significative tra i gruppi sperimentali e i controlli dopo lo stesso tempo di esposizione. Le differenze statistiche significative sono rappresentate da lettere ($p < 0.05$ - test

ANOVA a due vie/test di confronto multiplo di Tukey). Lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra le due concentrazioni di xenobiotici testate allo stesso punto temporale (T1 o T2). Le lettere maiuscole diverse rappresentano differenze significative tra la stessa concentrazione di PROP-ESA dopo un diverso tempo di esposizione. E1 = 3,5 µg/L; E2 = 35 µg/L; CMC = cambiamenti cellulari e morfologici; TA = alterazione tubulare; ITC = cambiamenti del tessuto intertubulare.

Tabella 20: Indice di condizione istopatologica I_h di *Mytilus galloprovincialis* esposto al 3.5 µg/L (E1) e 35 µg/L (E2) di PROP-ESA dopo 10 (T1) e 20 (T2) giorni.

Organo	Reazione modello	Tempo di esposizione (giorni)	Gruppi Sperimentali		
			Controllo	E1 (3.5 µg/L)	E2 (35 µg/L)
Branchie	Cambiamenti cellulari e morfologici	T1 (10)	0,108±0,012	0,158±0,002	0,198±0,002
		T2 (20)	0,118±0,012	0,255±0,007	0,297±0,004
Ghiandola Digestiva	Alterazioni tubulari	T1 (10)	0,105±0,007	0,156±0,005	0,197±0,003
		T2 (20)	0,117±0,010	0,238±0,002	0,266±0,004
	Cambiamenti del tessuto intertubulare	T1 (10)	0,095±0,007	0,136±0,004	0,186±0,004
		T2 (20)	0,108±0,011	0,218±0,002	0,255±0,007

I valori sono presentati come medie ±S.D (n =4).

3.5.4. Discussioni

Negli ultimi decenni, le attività industriali e agricole, la gestione dei rifiuti non sempre corretta e l'urbanizzazione hanno comportato gravi rischi per l'ecosistema acquatico. L'inquinamento legato a queste attività umane può colpire direttamente o indirettamente gli habitat e gli organismi della fauna selvatica (Porretti et al., 2022; Zicarelli et al., 2022; Rashid et al., 2010). Pertanto, una valutazione dell'impatto degli inquinanti sulle specie acquatiche è fondamentale per identificare le principali attività inquinanti, le loro origini e il loro destino nell'ambiente acquatico tramite l'uso anche di organismi modello (Ravi et al., 2023; Amoatey e Baawain, 2019). L'erbicida propaclor fa parte di questi inquinanti, rendendo possibilmente vulnerabili organismi non bersaglio come i molluschi (Tulcan et al., 2021). Tuttavia, non solo i composti parentali minacciano i sistemi biologici, ma anche i loro prodotti biodegradabili potrebbero rivelarsi più tossici del composto stesso.

Un buon esempio potrebbe essere il presente studio, che si concentra sulla tossicità del PROP-ESA, uno dei metaboliti primari del composto madre propaclor (cloroacetanilide). Sono stati condotti solo alcuni studi sulla tossicità del propaclor su organismi non bersaglio (ad esempio, Dierickx, 1999; U.S. EPA, 1998; WHO e IPCS, 1993), ma mancano informazioni sul suo metabolita PROP-ESA. Poiché si suppone che gli erbicidi cloroacetanilidi e i loro metaboliti abbiano modalità d'azione simili, gli effetti tossici, tra cui la tossicità immunitaria e dello sviluppo, l'alterazione del sistema endocrino, il danno al DNA e l'attività enzimatica (Ramesh et al., 2023; Kumar et al., 2022; Mai et al., 2014; Tu et al., 2013), potrebbero essere attesi come possibili risultati. Per questi motivi, i risultati ottenuti dal presente studio sono preziosi e possono essere considerati un passo avanti nella gestione delle concentrazioni residue all'interno degli ecosistemi acquatici. La verifica analitica delle concentrazioni di PROP-ESA nei tessuti molli di *M. galloprovincialis*, che è uno degli organismi essenziali tra gli anelli della catena alimentare, è dovuta principalmente al fatto che le conoscenze sul bioaccumulo di PROP-ESA (cinetica e metabolismo) in questo animale non sono ben comprese. Per quanto riguarda i risultati ottenuti dalla valutazione analitica delle concentrazioni di PROP-ESA nei tessuti molli dei mitili e nell'acqua, è stato osservato un aumento nel gruppo E2 (T1:

2,12; T2: 5,40) rispetto al gruppo E1 (T1: 2,12; T2: 5,30) dopo entrambi i tempi di esposizione.

I nostri risultati mostrano un BCF più basso (anche nel gruppo E2, dove abbiamo testato dieci volte la concentrazione ambientale) rispetto al suo composto parentale, il cui BCF è dato al livello 8,5 dall'U.S. EPA (1998). Nel gruppo di controllo, la concentrazione di PROP-ESA è stata rilevata nei tessuti dei mitili e nell'acqua del lago al di sotto del LOD. Pertanto, si può supporre che l'allevamento di molluschi gestito sul lago non sia contaminato da questo metabolita. Gli stessi risultati sono stati ottenuti dallo studio di Camps Bay (Città del Capo, Sudafrica) (Ojemaye et al., 2020), dove tutti gli erbicidi cloroacetanilidi nelle patelle (*Cymbula granatina*), nel *M. galloprovincialis* e nel riccio di mare (*Parachinus angulosus*) erano inferiori al LOD. Inoltre, secondo la classificazione dell'UE, il potenziale di bioaccumulo di una sostanza chimica in un organismo è BCF >100. Tuttavia, il PROP-ESA può essere classificato come “pericoloso per ambiente” poiché potrebbe compromettere la salute degli organismi, portando al trasferimento e all'accumulo della sostanza lungo la catena alimentare (Costanza et al., 2012; Chapman et al., 1996). I mitili, e i pesci in generale, sono organismi in grado di filtrare le sostanze xenobiotiche con cui entrano in contatto (Jebara et al., 2021; Di Bella et al., 2018a, b,c, d, 2017, 2010). L'accumulo di queste sostanze, spesso tossiche, nell'organismo di questi molluschi è quindi facile. Studi precedenti confermano questa capacità, mostrando come *M. galloprovincialis* si esponga a diverse concentrazioni da 0 a 40 µg/L di ittrio, un metallo raro, si accumula in modo significativo nei tessuti dei mitili. Anche se i livelli di BCF diminuiscono con l'aumentare della concentrazione, questo potrebbe assumere una forma di salvaguardia dell'animale, preservandolo dagli effetti tossici di questo metallo (Andrade et al., 2023).

Il nostro studio ha mostrato come i livelli di PROP-ESA nei tessuti aumentano con la concentrazione e il tempo di esposizione. Infatti, a T1, i livelli di concentrazione di E1 ed E2 erano di 743 ng/g e 185,52 ng/g; al T2, 8,15 ng/g e 191,91 ng/g, rispettivamente. Da T1 a T2, entrambe le concentrazioni (E1, E2) mostrano una differenza significativa ($p < 0,01$) rispetto al gruppo di controllo (Tabella 20). Un andamento simile si osserva per l'esposizione all'erbicida neonicotinoide thiacloprid, che mostra anch'esso un aumento

graduale della concentrazione con l'aumentare della durata dell'esposizione, a partire dalla concentrazione più bassa (4,5 µg/L) a quella più alta (450 µg/L) (Stara et al., 2021). È noto che l'erbicida propaclar è un composto stabile con un'emivita in soluzione acquosa fino a 890 giorni (Liu et al., 2011) e un K_{ow} (coefficiente ottanolo-acqua) $\log P = 1.6$ (PPDB, 2023). Tuttavia, non sono disponibili informazioni per il PROP-ESA. In generale, il K_{ow} è utile per stimare la distribuzione delle sostanze chimiche all'interno di un organismo. Un K_{ow} basso, come nel nostro caso, è correlato a composti idrofili, che si trovano principalmente nelle regioni acquose, piuttosto che a composti lipofili, come i lipidi. Inoltre, il basso K_{ow} del suo precursore e i livelli di bioaccumulo e BCF che sono stati determinati, si può presumere che il PROP-ESA sia scarsamente assorbito da organismi acquatici come *M. galloprovincialis*. Anche se la quantità di PROP-ESA accumulata nel corpo dei mitili non è nel corpo del mollusco non sia enorme, ciò non toglie che le quantità rilevate nel nostro studio possono mediare effetti tossici negli animali. Il fatto che non vi siano cambiamenti significativi nella composizione del profilo biochimico dell'emolinfa è in correlazione con i risultati insignificanti della vitalità cellulare. L'emolinfa, un fluido con una funzione simile a quella del sangue, è un vettore di informazioni cruciale, che ci permette di comprendere meglio i processi alla base delle cellule in situazioni quotidiane e in situazioni di stress causate da agenti inquinanti. Pertanto, anche i saggi di vitalità cellulare sono strumenti utili e completi per comprendere meglio lo stato di salute di *M. galloprovincialis* (Faggio et al., 2016). In questo caso, l'esposizione a PRO-ESA a due concentrazioni non ha fatto registrare cambiamenti significativi nella vitalità complessiva sia in T1 che in T2. Si potrebbe parlare di una forma di adattamento o resistenza alla presenza di questo inquinante.

La composizione dell'emolinfa può variare in base a diversi parametri, tra cui la qualità dell'acqua, con parametri il pH, la temperatura, la salinità, la concentrazione di ioni e la presenza o meno di xenobiotici (Capillo et al., 2018). Gli ioni Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , Na^+ e PHOS sono componenti essenziali dell'emolinfa in quanto coinvolti in diverse funzioni, tra cui il metabolismo, le funzioni enzimatiche, la formazione del guscio, l'osmoregolazione, i processi anabolici e catabolici e in generale il mantenimento dell'omeostasi dell'animale. In quanto organismo osmoregolatore, il mitilo è in grado di mantenere la sua osmolarità

interna simile a quella dell'acqua in cui vive (Pagano et al., 2022a, b). La capacità di questa specie di adattarsi o resistere alla presenza di inquinanti, come il metabolita erbicida PROP-ESA, è confermata dalle variazioni non significative dei parametri biochimici.

La GD di *M. galloprovincialis* effettua la digestione dei nutrienti necessari alla sopravvivenza dell'organismo. Inoltre, la GD ha un'essenziale funzione di disintossicazione. D'altra parte, questo organo proprio per le sue caratteristiche ha una solida predisposizione all'accumulo di inquinanti (Tresnakova et al., 2023; Curpan et al., 2022; Pagano et al., 2022a,b). Per questi motivi, i test di vitalità cellulare sono preziosi per comprendere lo stato di salute dell'animale (Impellitteri et al., 2022). Sulla base dei metodi RVD, la vitalità delle cellule del GD è diminuita significativamente in E2, con una vitalità del 94% nel metodo TB e del 95% nel metodo RN dopo i 10 giorni rispetto al controllo e a E1, con una vitalità del 99% per entrambi i gruppi con entrambe le colorazioni. Questa diminuzione della vitalità cellulare può indicare un danno alla membrana cellulare. Questi risultati sono paragonabili ad altri lavori presenti in letteratura (ad esempio, Tresnakova et al., 2023; Pagano et al., 2022a,b; Stara et al. 2020 a,b; Messina et al., 2014), e possono evidenziare un affetto nei meccanismi fisiologici essenziali per la sopravvivenza dell'organismo da esposizione cronica alla concentrazione residua nel loro ambiente naturale. Tuttavia, dopo il T2, la vitalità delle cellule GD non è stata significativamente influenzata. Questi risultati potrebbero indicare un adattamento delle cellule e dell'intero organismo alla condizione di stress chimico imposta dalla presenza dell'agente esterno. Infatti, i mitili sono organismi estremamente resistenti e possono adattarsi nel tempo alle condizioni ambientali avverse in cui vivono (Lassoued et al., 2019; Nardi et al., 2017).

L'interazione dannosa di PROP-ESA con le cellule GD è dimostrata non solo dall'accumulo lisosomiale e dalla successiva instabilità lisosomiale, verificata mediante il test della colorazione con RN, ma anche dall'incapacità delle cellule di recuperare il proprio volume dopo una esposizione a una soluzione ipotonica. Ciò viene dimostrato dal danno sia al citoscheletro che alle proteine canale, come dimostrato dall'esperimento RVD, sia il danno alla membrana cellulare, come dimostrato dal test di esclusione della

TB. La regolazione del volume cellulare per le cellule della GD è necessaria per mantenere la funzione dell'organo (Barmo et al., 2013; Dimitriadis et al., 2004). Infatti, in condizioni fisiologiche normali, in cui l'animale non è esposto ad agenti esterni/inquinanti, le cellule possono rispondere alle variazioni di osmolarità, ripristinando il loro volume cellulare. Pertanto, gli erbicidi e i loro metaboliti probabilmente inibiscono le strutture cellulari che regolano i cambiamenti osmotici, creando danni. Infatti, in entrambi i tempi di esposizione T1 e T2 (Figura 19A e B) e sia in E1 che in E2, l'inquinante ha influenzato la capacità delle cellule della GD di regolare il loro volume cellulare. Si nota una tendenza significativa per le cellule di GD del gruppo E2 dopo T1 ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Al contrario, dopo il T2, le cellule della GD non hanno mostrato un cambiamento significativo a entrambe le concentrazioni rispetto al gruppo di controllo.

Mentre le cellule esposte all'inquinante hanno mantenuto la capacità di gonfiarsi in presenza della soluzione ipotonica somministrata, ma non sono riuscite a ripristinare il volume iniziale. Queste modifiche implicano che il danno coinvolga elementi del citoscheletro e sistemi di trasporto degli ioni K^+ e Cl^- regolarmente implicati nelle attività di regolazione del volume cellulare (Torre et al., 2013; Silva e Wright, 1994). Questa incapacità di tornare alle condizioni iniziali, considerate ottimali dall'organismo, è evidente soprattutto dopo il T1. Prolungando il periodo di esposizione, i dati ottenuti supportano la tesi che i mitili possano adattarsi in qualche modo agli effetti velenosi mediati.

Mancano dati sull'influenza del PROP-ESA sullo stato ossidativo su diversi organismi acquatici. È stata riportata una modulazione dei marcatori pro-ossidanti e antiossidanti in risposta ad altri membri dei cloroacetanilidi, anche se sono riportate in pochissime specie di pesci ciprinidi. Ad esempio, l'esposizione al butacloro ha indotto la LPO e l'attività degli enzimi antiossidanti nel fegato, nei reni e nelle branchie di *Cyprinus carpio* (Tramboo et al., 2010), mentre l'alacoloro ha influenzato il sistema antiossidante epatico di *Carassius auratus* (Yi et al., 2007). Il nostro studio è il primo a mostrare un effetto diretto del PROP-ESA sullo stato ossidativo del modello acquatico *M. galloprovincialis*. In particolare, abbiamo osservato che, dopo il T1, la concentrazione più alta di PROP-ESA

testata ha aumentato la LPO sia nelle branchie che nella GD; dopo il T2, e solo alla concentrazione più bassa utilizzata, nella GD. Anche i risultati della carbonilazione proteica sono stati influenzati dal PROP-ESA, ma solo nelle branchie; sono stati osservati alti livelli di derivati chetonici in ogni condizione testata, mentre i derivati aldeidici sono aumentati solo dopo T1 in E2.

L'introduzione di gruppi carbonilici (cioè, aldeidi e chetoni reattivi) nelle proteine può avvenire per ossidazione delle catene laterali degli amminoacidi o attraverso la scissione ossidativa delle proteine per via α -amidativa o per ossidazione delle catene laterali glutammiliche, portando così alla formazione di derivati chetonici. Inoltre, la coniugazione con aldeidi, prodotte durante la perossidazione lipidica, e con derivati carbonilici reattivi, generati dalla reazione con carboidrati riducenti, può causare la carbonilazione delle proteine (Møller et al., 2011). I risultati del nostro studio dimostrano che il PROP-ESA può attivare, in modo specifico per ogni tessuto, diverse vie ossidative intracellulari di carbonilazione proteica. La relazione lineare tra i derivati aldeidici e la perossidazione lipidica osservata nelle branchie ma non nella GD può sostenere questa ipotesi.

L'enzima SOD, convertendo l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) in H_2O_2 , rappresenta una prima linea di difesa contro i radicali dell'ossigeno. L'esposizione ai pesticidi è stata associata all'induzione di stress ossidativo e a una diversa modulazione dei sistemi antiossidanti cellulari, questi ultimi talvolta risultano inibiti (Sule et al., 2022). Dopo il T2, abbiamo osservato un aumento significativo dell'attività SOD solo nelle branchie degli animali trattati con PROP-ESA a entrambe le concentrazioni. Un'attivazione tissutale diversa dell'enzima SOD in risposta agli inquinanti non è rara nei *Mytilus spp.* In particolare, in *M. galloprovincialis*, l'esposizione all'erbicida glifosato ha influenzato l'attività della SOD in modo tessuto-specifico, con una riduzione nella GD e nessun effetto sulle branchie (Matozzo et al., 2018). I risultati del nostro studio suggeriscono che le branchie sono suscettibili al danno ossidativo; probabilmente, l'aumento dell'attività della SOD che abbiamo osservato può rappresentare un meccanismo di difesa contro la produzione prolungata di ROS.

In base alle valutazioni istopatologiche effettuate, i pattern di reazione più frequentemente documentati, come infiltrazioni di emociti, alterazioni epiteliali e aggregati di lipofuscina, suggeriscono un'inflammatione infiltrativa come risposta all'esposizione al PROP-ESA (De Vico e Carella, 2012). Gli organi target per l'analisi istologica sono stati scelti in base al loro ruolo nello svolgimento di funzioni vitali per i bivalvi, come l'alimentazione e la respirazione nel caso delle branchie (Stara et al., 2020a; 2020b; Azevedo et al., 2015; Canesi et al., 2012) o la regolazione metabolica e la detossificazione degli xenobiotici, operata principalmente dalla ghiandola digestiva (Pagano et al., 2016; Gomes et al., 2012; Koehler et al., 2008). Da un punto di vista funzionale, le branchie rappresentano la prima interfaccia con l'ambiente acquatico, mentre la GD potrebbe essere paragonato al fegato dei vertebrati (Tresnakova et al., 2023). Per questi motivi, branchie e GD sono considerati tessuti sentinella preziosi per determinare la risposta a un'inflammatione utilizzando l'indice di condizione istopatologica (Costa et al., 2013).

Considerando le risposte istologiche osservate nei tessuti dei mitili analizzati, la presenza di depositi di lipofuscina ha confermato l'andamento di un processo infiammatorio, segni inequivocabili dell'attività immunitaria dei “sistemi a catena attivanti la pro-fenolossidasi (PO)” coinvolti principalmente in fenomeni come il riconoscimento e l'incapsulamento di sostanze estranee (Stara et al., 2021; De Vico e Carella, 2012). Anche l'infiltrazione emocitaria, ampiamente documentata infiltrazione di emociti è stata messa in relazione con l'inflammatione, derivante da un flusso emolinfatico in aumento, necessario alle cellule difensive per raggiungere il sito di infiammazione e penetrare nell'epitelio attraverso la diapedesi (Pagano et al., 2016). Come indicato nella sezione dei risultati, queste due reazioni, osservati principalmente nei tessuti branchiali, hanno mostrato un andamento crescente in relazione alla tendenza all'aumento in relazione alla concentrazione dello xenobiotico e al tempo di esposizione. esposizione. Altre frequenti aberrazioni branchiali attribuibili all'esposizione a propaclor sono alterazioni lamellari, vacuolizzazione e alterazioni epiteliali che minacciano seriamente la sopravvivenza dei bivalvi, compromettendo la funzione respiratoria e alimentare (Pagano et al., 2016; Carballeira et al., 2011; Auffret, 1988). Per quanto riguarda i tessuti di GD analizzati,

l'estensione meno grave delle lesioni documentate lesioni documentate è probabilmente dovuta alla già citata funzione di detossificazione di quest'organo, come già riportato in letteratura (Tresnakova et al., 2023).

3.5.5. Conclusioni

Questo studio è stato il primo a evidenziare gli effetti a lungo termine del PROP-ESA su un organismo modello, *M. galloprovincialis*, per lo più in relazione a tendenze dipendenti dal tempo e dalla dose. Questo studio ha rivelato legami tra la risposta biochimica e istologica dell'organismo e lo stress chimico causato dall'acqua contaminata da PROP-ESA. Tra i risultati spicca soprattutto la capacità di bioaccumulo del PROP-ESA nei tessuti dei mitili commestibili. Questi risultati sono importanti per gli allevamenti di molluschi gestiti in acque naturali, soprattutto se si considera che i bivalvi sono un anello essenziale della catena alimentare. Inoltre, l'applicazione eccessiva e ripetuta di pesticidi cloroacetanilidi in agricoltura, e quindi dei loro metaboliti, è necessaria per raggiungere una maggiore produzione di colture per aumentare la crescita della popolazione; l'importanza dello screening dei loro potenziali rischi sugli organismi acquatici non bersaglio è ancora impegnativa. Pertanto, questi dati sono preziosi per le agenzie di regolamentazione, fornendo una banca dati sulla tossicità degli inquinanti ambientali ed evidenziando le future esigenze di ricerca.

3.6. Impatto della Clorpromazina sul *Mytilus galloprovincialis*: un'indagine su più fronti

3.6.1. Premesse

I composti farmaceutici sono diventati nel tempo degli inquinanti nell'ambiente acquatico ad alta priorità (Burgos-Aceves et al., 2023; Fabbri e Franzellitti, 2016; Desbiolles et al., 2018; Moreira et al., 2022; Ortúzar et al., 2022). A causa del loro uso estensivo, si ritrovano nei condotti idrici attraverso le acque reflue non adeguatamente depurate provenienti da varie fonti, in particolare dagli ospedali ad esempio (Mauro et al., 2021; Trombini et al., 2022). Tra i prodotti farmaceutici che destano preoccupazioni presenti nelle acque superficiali, i farmaci antipsicotici hanno ricevuto un'attenzione particolare nel corso del tempo (Wronski e Brooks, 2023; Abo-Al-Ela et al., 2023). Essi hanno un profilo farmacologico complesso, che agisce su recettori comuni a diversi phyla, spesso definite “droghe sporche” (Escudero et al., 2021). Le fenotiazine, in generale, rappresentano una classe diversificata di farmaci usati per il trattamento di patologie psichiatriche e non, tra cui la schizofrenia, il disturbo bipolare, la nausea e le infezioni parassitarie (Edinoff et al., 2022). La clorpromazina (Cpz), in particolare, è stata approvata per il trattamento della schizofrenia e delle psicosi schizofreniche da oltre 70 anni (Dudley et al., 2017). Inoltre, sono state scoperte le sue potenziali applicazioni nel trattamento del cancro grazie al suo effetto sulla replicazione del DNA (Darkin et al., 1984; Lee et al., 2015). Poiché tutte le classi di psicofarmaci hanno mostrato rischi di sicurezza potenzialmente rilevanti per le persone con COVID-19 (Ostuzzi et al., 2020), la Cpz ha ricevuto particolare attenzione per il suo effetto di stabilizzazione della membrana nei confronti del SARS-CoV-2 (Stip et al., 2020). Di conseguenza, è cresciuto l'interesse per il suo destino nelle acque superficiali. La presenza della clorpromazina nelle acque è spesso poco cospicua. I rapporti indicano un tasso di rimozione dell'81% da parte degli impianti di trattamento delle acque (Vieno et al., 2017) e la luce solare e l'irradiazione UV possono degradare completamente la Cpz nell'acqua entro poche ore. Tuttavia, concentrazioni comprese tra 5 e 364 ng/L sono state rilevate negli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue di Pechino (Yuan et al., 2013). Inoltre, i prodotti di

trasformazione della Cpz possono essere più tossici del composto stesso. In assenza di esposizione alla luce solare, la Cpz si adsorbe fortemente ai sedimenti e può essere rilevata nelle acque fluviali fino a quattro settimane (Natecz-Jawecki et al., 2008; Jiménez et al., 2016). Sebbene la Cpz sia stata classificata come non biodegradabile in tutti i test di biodegradazione applicati, gli esperimenti di frammentazione cromatografica e spettrometrica di massa hanno indicato la presenza di un totale di 61 prodotti di trasformazione abiotici e biotici (Trautwein e Kümmerer, 2012). La necessità di studiare l'ecotossicità della Cpz nelle acque superficiali è stata sottolineata nelle ricerche di Reichert et al., (2019) e Wronski & Brooks (2023), che lo hanno identificato come un composto presente negli scarichi delle acque reflue e nelle acque superficiali di tutto il mondo e lo hanno indicato come un antipsicotico relativamente poco studiato. Questi risultati sottolineano l'importanza di studiare l'impatto della Cpz sugli organismi acquatici. Tuttavia, a causa del suo ampio spettro di attività biologiche, la previsione degli effetti della Cpz come contaminante nelle acque è particolarmente complessa. Sono state osservate varie manifestazioni della sua tossicità in diversi phyla. La tossicità acuta della Cpz è stata riportata con valori di LC50 a 24, 48 o 96 ore che variano da circa 0.3 a 2 mg/L, a seconda della specie e della temperatura di esposizione (come rivisto da Feng et al., 2022). L'esposizione a breve termine (72 ore) alla Cpz ha inibito la metamorfosi nelle larve di *Mytilus galloprovincialis*, con una concentrazione IC50 di 0.5 mg o 1.6 µM (Yang et al., 2011). Alcuni marcatori biochimici sono stati documentati in queste esposizioni acute. In particolare, è stato osservato stress ossidativo in pesci rossi d'acqua dolce (*Carassius auratus*) esposti alla Cpz a concentrazioni di 1;11; 0,43 e 0,32 mg/L per 24, 48 e 96 ore (Li et al., 2008). Tuttavia, l'esposizione a breve termine (48 ore) della specie di cladocero *Daphnia magna* alla Cpz a concentrazioni di 10 ng/L, 1 µg/L e 250 µg/L non ha comportato alcuna variazione della colinesterasi (ChE) o delle attività degli enzimi antiossidanti, tranne che per l'attivazione della catalasi alla concentrazione di 1 µg/L (Oliveira et al., 2015). Questi cambiamenti enzimatici sono stati “quasi trascurabili” (Oliveira et al., 2015), indicando effetti non significativi. La tossicità subcronica della Cpz per le specie acquatiche è indicata principalmente da metriche di popolazione, comportamento e distorsioni fisiologiche (de Oliveira et al., 2016). Gli effetti sulla

popolazione, come la diminuzione del numero di esemplari e del tasso di popolazione, sono stati osservati in *Daphnia magna* esposta a basse concentrazioni dal punto di vista ambientale della Cpz (da 250 a 710 µg/L) per 21 giorni.

I molluschi bivalvi sono riconosciuti come bioindicatori nelle esposizioni subcroniche a farmaci a concentrazioni pM e nM (Freitas et al., 2023; Freitas et al., 2021; Franzellitti et al., 2015; Impellitteri et al., 2023a; Khoma et al., 2020a, 2022; Martyniuk et al., 2023; Martyniuk et al., 2021a,b). Il loro stile di vita da filtratori sessili consente loro di concentrare efficacemente gli xenobiotici (Impellitteri et al., 2023c; Torre et al., 2013a,b; Pain-Devin et al., 2014; Kerambrun et al., 2015; Ladeiro et al., 2016; Breitwieser et al., 2016; Freitas et al., 2020; Khan et al., 2020; Pagano et al., 2020). Tuttavia, in generale si può affermare che gli studi biochimici si concentrano solitamente e prevalentemente sulle risposte allo stress ossidativo (Banaee et al., 2023; Shiry et al., 2023a,b), che possono manifestarsi come effetti collaterali non specifici a seguito di un'esposizione farmaceutica prolungata o ad alte dosi (Fabbri & Franzellitti, 2016). Sono quindi necessarie maggiori informazioni sugli effetti specifici di vari inquinanti come la Cpz, compresi l'accumulo e la biotrasformazione negli animali acquatici, soprattutto considerando che alcuni farmaci sono stati trovati in queste importanti fonti alimentari umane (Faggio et al., 2018; Liu et al., 2015; Madikizela et al., 2020). In questo contesto, la ghiandola digestiva sembra certamente essere l'organo cruciale. Per avere un quadro completo dei cambiamenti causati dalla presenza di Cpz, abbiamo condotto studi istologici anche su questo organo. Inoltre, abbiamo eseguito analisi dettagliate del bisso, la struttura di attacco specializzata delle cozze *Mytilus spp.*

M. galloprovincialis, in quanto organismo sessile, è in grado di ancorarsi a varie superfici, come pali, rocce, pietre, attraverso la produzione di bisso collagene (Curpan et al., 2022). Il bisso delle specie *Mytilus spp.* ha origine nei muscoli anteriori e posteriori del retrattore bissale e può essere suddiviso in tre regioni: la placca (il punto di attacco del bivalve al suo substrato), il filo e il gambo. Il filo di bisso è composto da una varietà di proteine e aminoacidi, con le fibre di collagene come componente principale. Quando le cozze sono in buona salute e dispongono di un'ampia riserva di energia, possono investire nella produzione di bisso, che serve come meccanismo di attaccamento e come mezzo per

assicurarsi nel loro ambiente (Carrington et al., 2015). Tuttavia, questa allocazione di energia ha un costo. Distoglie risorse da altre funzioni fisiologiche essenziali, rendendo il mitilo più vulnerabile a condizioni sfavorevoli e alla potenziale esposizione a xenobiotici o a molecole che inducono stress ossidativo (Burnett e Sara, 2019). In risposta a fattori ambientali sfavorevoli, i mitili impiegano strategie protettive chiudendo il guscio e riducendo l'attività metabolica (Stara et al., 2020a,b; Shiry et al., 2023a,b). Questa risposta adattativa li aiuta a conservare l'energia e aumenta la loro capacità di resistere a condizioni difficili, come la presenza nel loro ambiente di diverse classi di sostanze, tra cui farmaci (Ericson et al., 2010), pesticidi (Tresnakova et al., 2023a, 2023b) e PCB (Roberts, 1975), e alla presenza di predatori (Farrell e Crowe, 2007).

La natura idrofobica dei composti eterociclici triciclici di classe fenotiazinica come la Cpz, che sono praticamente insolubili in acqua, e la loro capacità di aggregarsi e di essere assorbiti dai sedimenti (Natecz-Jawecki et al., 2008; Jiménez et al., 2016), ne rendono cruciale lo studio della relazione tra l'accumulo di Cpz nei mitili (come marcatore di esposizione) e le risposte biochimiche (come marcatori di effetto), che possono in ultima analisi portare a esiti negativi (Khan et al., 2020). Pertanto, questo studio ha voluto valutare l'accumulo della Cpz e i suoi effetti sugli enzimi di biotrasformazione, sulle proteine legate allo stress e alla resistenza farmaceutica e sulle attività apoptotiche nel mitilo marino *M. galloprovincialis*. La selezione delle attività di biotrasformazione si è basata sulle informazioni disponibili relative al coinvolgimento dell'attività del citocromo P450 di fase I nella biotrasformazione della Cpz nell'uomo (Coccia e Westerfeld, 1967), sull'induzione attesa di queste attività nei molluschi bivalvi esposti ai farmaci (come rivisto da Fabbri e Franzellitti, 2016), in particolare in *M. galloprovincialis* (Zanette et al., 2013), e su precedenti indicazioni di questo effetto nei mitili esposti alla Cpz (Khoma et al., 2022a). Ci si aspettava che la funzionalità dei lisosomi fosse coinvolta nella risposta alla Cpz, dal momento che la riduzione della stabilità della membrana lisosomiale è un marker consolidato di salute cellulare, direttamente correlato con la crescita e la sopravvivenza dei mitili, e serve come segnale di allarme precoce per i danni da farmaci (Fabbri e Franzellitti, 2016). Il coinvolgimento delle proteine di bilanciamento dello zinco, le metallotioneine, nella difesa e nella regolazione cellulare sembra essere un

meccanismo comune che determina la resistenza agli impatti negativi, compresi i prodotti farmaceutici (Notta & Koropatnick, 2006; Bozhkov et al., 2021). L'effetto preciso della Cpz sulla funzionalità dello zinco potrebbe anche essere legato ai processi calcio-dipendenti (Xu et al., 2010; Hamaguchi et al., 2014), che sono stati segnalati come bersaglio della Cpz (Choi et al., 2001). Inoltre, l'analisi delle proteasi apoptotiche, caspasi-3 e catepsina D, è stata condotta per chiarire gli esiti negativi dell'esposizione alla Cpz (Khan et al., 2020). Di conseguenza, questo studio mirava a rivelare se i presunti bersagli cellulari di questo farmaco rispondessero adeguatamente in *M. galloprovincialis* alle sue concentrazioni nell'acqua rilevanti per l'ambiente. In base ai risultati, la raccomandazione di esplorare questa specie bioindicativa dell'ecotossicità. L'attività di ricerca ha contribuito alla pubblicazione di un articolo su rivista indicizzata del quale si riportano le informazioni fondamentali, figure e tabelle (Figura 25).

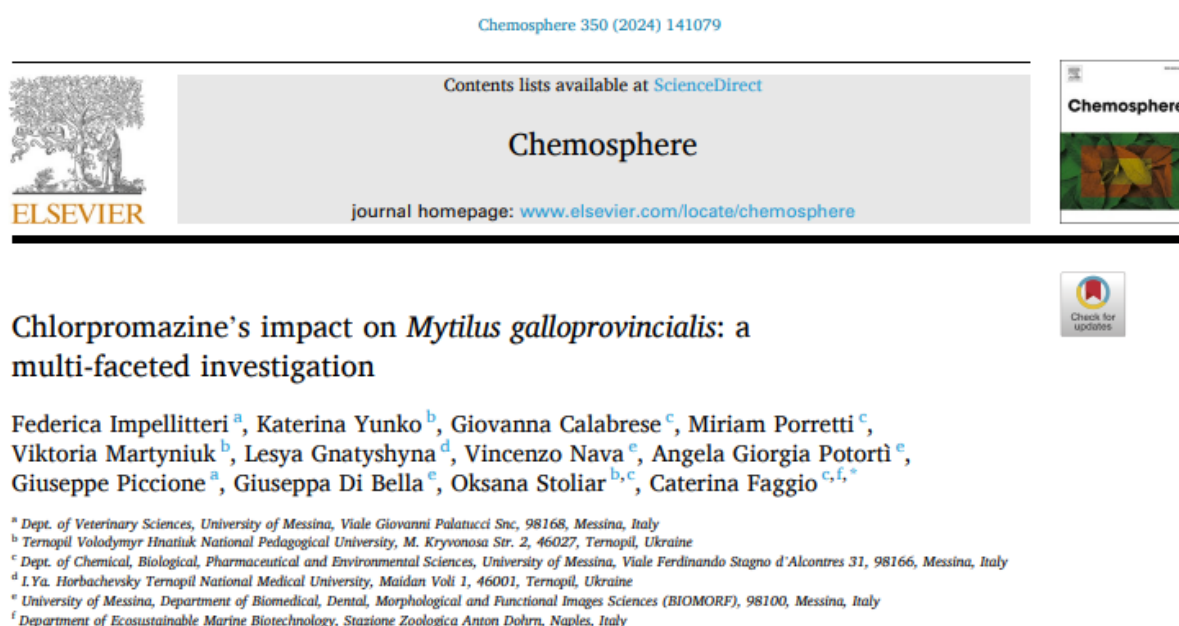


Figura 25: Impellitteri et al., 2024.

3.6.1.1. *I prodotti farmaceutici nell'ambiente marino*

I prodotti farmaceutici possono essere sia di natura sintetica o derivati da composti chimici organici o inorganici di origine naturale e sono usati per prevenire e trattare malattie di diversa natura, inoltre trovano applicazione anche nella diagnostica in umani e animali, implementando così la qualità della vita (Ojemaye & Petrik, 2019). I farmaci possono differire in termini della loro struttura e comportamento, la loro applicazione, il metabolismo e inoltre dei loro effetti nell'ambiente (Fawell and Ong, 2012; Jiang et al., 2013).

Ulteriormente, la presenza di questi farmaci possono causare danni all'ambiente influenzando la distribuzione di specie chiave e favorendo la diffusione di geni resistenti nell'ecosistema (Costanzo et al., 2005).

Il primo rilevamento di prodotti farmaceutici come contaminanti ambientali è stato riportato da Richardson e Bowron (1985), anche se il loro impatto ecologico negativo è stato riconosciuto solo alla fine degli anni Novanta, quando sono stati descritti come agenti di un sottile ma costante cambiamento (Daughton e Ternes 1999). A partire dai primi anni 2000, sono state condotte ricerche approfondite sulla rilevazione di farmaci e residui farmaceutici nelle fonti idriche (Kanakaraju et al., 2014). Sebbene diversi studi abbiano affrontato la presenza e il destino dei farmaci nelle acque superficiali (Santos et al., 2010; Wang e Gardinali 2012; Gorga et al., 2013; Klosterhaus et al., 2013; Miller et al. 2015), le acque marine sono state a lungo trascurate, nell'ipotesi che la loro diluizione rappresentasse un fattore di sicurezza.

Van Doorslaer et al. (2014) hanno riportato che oltre 5000 farmaci prodotti per il consumo umano e animale sono stati resi accessibili sul mercato pubblico. Dall'avvento del COVID-19, si è registrato un'impennata dell'uso di farmaci a livello globale. La pandemia continua tutt'ora ad avere un impatto sul mercato farmaceutico mondiale, prevedendo un aumento di 500 miliardi di dollari dal 2020 al 2027, con una crescita prevista principalmente nei paesi quali America Latina, Asia e Africa, grazie anche all'aumento demografico e un maggiore accesso ai farmaci. Tra le aree terapeutiche con le maggiori previsioni di spesa nel 2027 vi sono l'oncologia, l'immunologia e gli antidiabetici, seguite da quelle cardiovascolari (Figura 26).

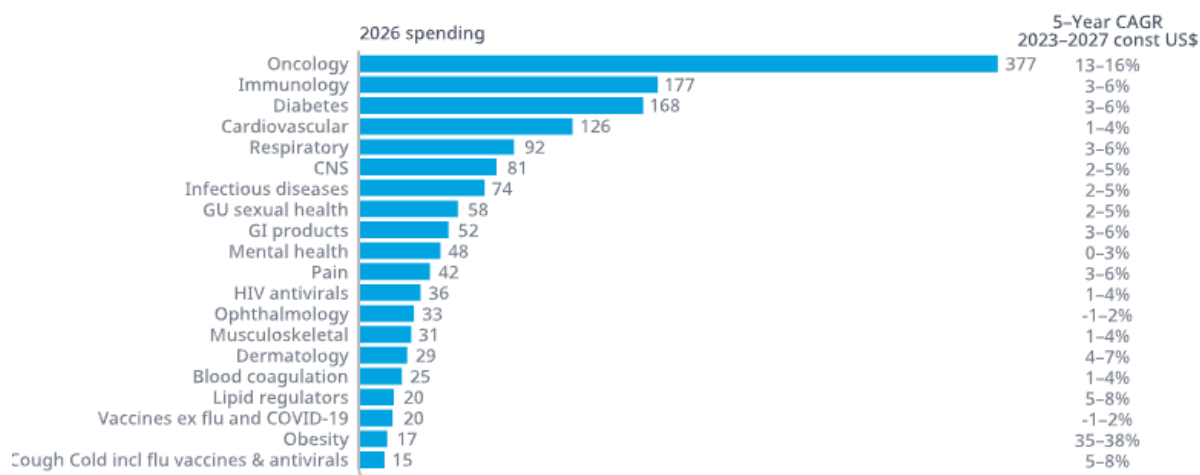


Figura 26: L'uso Globale dei Farmaci 2023 e Prospettive al 2027 (Istituto IQVIA per la Scienza dei Dati Umani, Gennaio 2023).

La spesa per la salute mentale occupa ancora una buona fetta di mercato e le previsioni a 5 anni ne danno un aumento tra lo 0 e il 3% (IQVIA, 2023). Anche a livello nazionale, la spesa per i farmaci ha registrato un aumento del 6% dal 2021 al 2022, pari a 34 miliardi di euro, con oltre 6 cittadini su 10 che abbiano almeno ricevuto una prescrizione di farmaci (Rapporto-OsMed, 2022). Questo stesso rapporto sottolinea come i disturbi psicotici costituiscano un notevole onere dal punto di vista dei costi sociali e della sanità pubblica. La schizofrenia, in particolare, è associata a una mortalità prematura 2-3 volte superiore rispetto alla popolazione generale. Tra il 2014 e il 2021, il consumo di antipsicotici è aumentato di oltre il 20%. Inoltre, si registra una significativa variabilità regionale non attribuibile a una diversa prevalenza delle patologie mentali. L'uso degli antipsicotici cresce con l'età; in media, ogni utilizzatore è trattato per oltre quattro mesi, anche se metà dei pazienti rimangono in trattamento per meno di due mesi, e il 12.3% riceve una sola prescrizione nell'arco dell'anno.

A causa dell'aumento dell'uso di farmaci da parte di uomini e animali, insieme all'assorbimento incompleto nell'organismo, essi sono stati rilevati in diversi ambienti marini sia i farmaci progenitori e i loro metaboliti.

Le aree costiere, compresi gli estuari e le zone umide, sono tra gli habitat più produttivi del pianeta (Costanza et al., 1998; Gaw et al., 2015). Si stima che il 50% delle paludi

d'acqua salata, il 35% delle mangrovie, il 30% delle barriere coralline e il 29% delle erbe marine in tutto il mondo siano già andati perduti o degradati (Barbier et al., 2011). Questi ecosistemi forniscono servizi cruciali, tra cui la creazione di habitat per la riproduzione, il mantenimento della qualità dell'acqua attraverso il filtraggio e la rimozione di contaminanti e particolati in sospensione e la protezione dalle inondazioni costiere e dalle tempeste (Barbier et al., 2011). Inoltre, gli ecosistemi marini sono un'importante fonte di proteine e forniscono reddito attraverso la pesca e il turismo. Si stima che nel mondo 41 milioni di persone siano impiegate nell'industria della pesca (FAO, 2014). A livello globale, gli ecosistemi marini hanno subito un degrado significativo, con circa la metà di essa fortemente impattata dai fattori di stress antropici, tra cui la pesca eccessiva, l'ingegneria costiera, gli scarichi di un'ampia gamma di contaminanti e l'aumento delle popolazioni costiere (Small & Nicholls, 2003). L'innalzamento del livello del mare, l'acidificazione degli oceani, l'aumento delle fioriture algali e le zone di esaurimento dell'ossigeno sono ulteriori fattori di stress per alcuni ecosistemi marini (Crain et al., 2009; Li, 2003). Si stima che 2,3 miliardi di persone, ovvero il 41% della popolazione mondiale, vivano entro i limiti delle coste. Oltre il 50% dei Paesi costieri ha dall'80 al 100% della popolazione che vive entro 100 km dalla costa (Martinez et al., 2007). Due terzi delle 33 megalopoli del mondo (città con 48 milioni di abitanti) si trovano sulla costa. Il numero di persone che vivono lungo le coste è destinato ad aumentare e, con loro, anche il numero di persone che vivono lungo le coste (Small & Nicholls, 2003; Martínez et al., 2007; Sekovski et al., 2012).

3.6.1.2. *Farmaci nei prodotti per la cura della persona*

La regolamentazione sulle sostanze che possono essere impiegate nella formulazione di un cosmetico viene disciplinata come si è detto dal Regolamento (CE) n. 1223/2009, con i relativi allegati che ne elencano le sostanze che sono vietate, sotto restrizione e autorizzate. Scorrendo gli allegati, si notano alcune sostanze che sono usate anche come farmaci, anche se non vengono chiamati apertamente come farmaci, ma si notano che sono in quantità inferiori. La Legge federale sugli alimenti, i farmaci e i cosmetici (FD&C Act) riconosce che a volte alcuni prodotti soddisfano sia la definizione di cosmetico che di farmaco, e ciò accade ad esempio se un prodotto ha più di un uso. Un prodotto può essere classificato come farmaco, cosmetico o entrambi. L'FD&C Act definisce i farmaci come prodotti destinati a curare, trattare, attenuare o prevenire malattie, o ad influenzare la struttura o le funzioni del corpo umano. Se un prodotto riporta tali indicazioni, verrà regolamentato come farmaco. I cosmetici, invece, sono destinati ad abbellire, promuovere l'attrattiva, modificare l'aspetto o purificare, e non sono soggetti all'approvazione della FDA per la vendita, in quanto non mirano a influenzare la struttura o le funzioni del corpo. Questi prodotti borderline devono soddisfare i requisiti previsti sia per i cosmetici e i farmaci. Ad esempio, uno shampoo antiforfora è un cosmetico perché il suo uso previsto è quello di detergere i capelli, ed è anche un farmaco perché il suo uso previsto è quello di trattare la forfora. Tra le altre combinazioni di cosmetici/farmaci vi sono i dentifrici che contengono fluoruro e che hanno la pretesa di rinfrescare l'alito e pulire i denti. Allo stesso modo, i deodoranti che sono anche antitraspiranti e le creme idratanti e il trucco commercializzati con indicazioni sulla protezione solare sono prodotti cosmetici/farmaceutici. L'industria della cosmetica, anche per accattivare e incuriosire la clientela sembra che abbia coniato un nuovo termine, "cosmeceutica", ma questo termine non è riconosciuto a livello normativo da nessuna organizzazione né a livello europeo né americano. A volte le linee di demarcazione tra le due categorie diventano sottili o si sovrappongono. Quindi come si determina che uso se ne debba fare e quindi in quale categoria inserirlo? Vi sono diversi criteri:

1. Dichiarazioni sull'etichetta e nei materiali promozionali: Le affermazioni presenti sull'etichetta del prodotto, nella pubblicità, su Internet o in altri materiali promozionali possono definire l'uso previsto del prodotto. Ad esempio, se un prodotto è commercializzato come cosmetico ma dichiara di ripristinare la crescita dei capelli, ridurre la cellulite o trattare le vene varicose, potrebbe essere considerato un farmaco in base al suo uso previsto di trattare o prevenire malattie o di influenzare la struttura o le funzioni del corpo umano.

2. La percezione del consumatore: La reputazione del prodotto tra i consumatori è un altro criterio importante. È fondamentale comprendere perché i consumatori acquistano il prodotto e cosa si aspettano che faccia. Se i consumatori percepiscono un prodotto come terapeutico, questo può influenzarne la classificazione.

3. Ingredienti attivi: La presenza di ingredienti noti per il loro uso terapeutico può far sì che un prodotto sia considerato un farmaco. Un esempio è il fluoro nel dentifricio, che ha proprietà terapeutiche ben note.

Anche dal punto di vista se essi siano regolamentati sotto la legge di cosmetici o farmaci, può far capire al consumatore a quale categoria essi appartengono. Ad esempio, in America ai sensi dell'FD&C Act, i prodotti e gli ingredienti cosmetici, ad eccezione degli additivi coloranti, non richiedono l'approvazione della FDA prima di essere immessi sul mercato. I farmaci, invece, devono generalmente ricevere l'approvazione pre-commercializzazione da parte della FDA attraverso il processo di New Drug Application (NDA) o essere conformi a una “monografia” per una particolare categoria di farmaci, come stabilito dalla Over-the-Counter (OTC) Drug Review della FDA. Similmente accade in Europa, i cosmetici sono regolamentati dal Regolamento (CE) n.1223/2009 e valutati dalla Commissione attraverso il Comitato Scientifico per la Sicurezza dei Consumatori (CSSC). L'ECHA (Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche) fornisce un'approfondita valutazione, alla quale partecipa, per l'Italia, il Centro Nazionale per le Sostanze Chimiche, Prodotti Cosmetici e Protezione del Consumatore dell'Istituto Superiore di Sanità. Questo Centro risponde anche a specifiche richieste delle autorità di controllo nazionali.

3.6.2. Materiali e metodi

3.6.2.1. Disegno sperimentale

Durante l'esperimento, 240 molluschi bivalvi di *Mytillus galloprovincialis* sono stati raccolti e acquistati da un'azienda commerciale al "Lago di Faro" della "FARAU SRL, Frutti di Mare" a Messina, Italia. Le specie sono state in tre gruppi (due replicati di 40 animali per gruppi sperimentali) e sono stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per due settimane in sei acquari con 25L di acqua, equipaggiati con aeratori di ossigeno. Due concentrazioni di Clorpromazina (CAS n. 34468-21-8, Cpz 1: 12 ng/L o 37 pM; Cpz 2: 12 µg/L o 37 nM) sono state somministrate alle cozze per 14 giorni. Molluschi non trattati (gruppo-C) sono stati analizzati dopo lo stesso periodo. Ogni due giorni, l'acqua di ogni vasca è stata cambiata, e i reagenti sono stati somministrati per mantenere la concentrazione. I molluschi sono stati alimentati con acqua di lago filtrata arricchita con nutrienti, fornita dalla stessa compagnia (salinità: $3,4 \pm 0,02\%$, pH: $7,6 \pm 0,01$, T: $16,77 \pm 0,09$ °C). La stanza sperimentale era dotata di illuminazione naturale e di una temperatura di 18 °C. Dopo ogni cambio d'acqua, sono stati controllati salinità, pH e temperatura dell'acqua, che corrispondevano agli stessi valori iniziali. Inoltre, sono stati prelevati campioni d'acqua da ogni vasca per determinare la concentrazione nominale di Cpz. Dopo l'esposizione, per lo studio del bioaccumulo, pool di 10 molluschi sono stati immediatamente anestetizzati con ghiaccio e sezionati a 4 °C. Per i saggi biochimici, la ghiandola digestiva è stata sezionata e congelata (- 80 °C) fino al momento delle analisi. Per tutti i tratti biochimici, eccetto le concentrazioni di Zn nelle metallotioneine, sono stati preparati campioni di ghiandola digestiva da otto singoli molluschi di ciascun gruppo sperimentale.

3.6.2.2. Estrazione della clorpromazina dai campioni

Per le cozze di ciascun gruppo sperimentale, l'estrazione è stata eseguita secondo il metodo di Zhang et al. (2014), con alcuni adattamenti. In breve, l'intero tessuto delle cozze è stato tritato con un tritatutto. I campioni (circa 5.0 g) sono stati messi in una provetta da centrifuga e sono stati addizionati con 100 µL di standard interno (bromofos metile). Quindi è stato aggiunto il solfato di sodio anidro (6,0 g) per rimuovere l'acqua dal campione e nella stessa provetta è stato aggiunto acetato di etile (25 mL). Dopo l'omogeneizzazione mediante miscelazione al vortex per 20 s, i campioni sono stati ultracentrifugati a 8000 rpm per 10 min. Il surnatante è stato quindi trasferito in una bottiglia di distillazione e poi evaporato a 45 °C fino a secchezza. Di seguito sono stati aggiunti acetonitrile saturo di *n*-esano (2 mL) e *n*-esano saturo di acetonitrile (3 mL), che sono stati inseriti in un bagnomaria ad ultrasuoni per 10 min, omogeneizzati e quindi trasferiti in una provetta di vetro da 10 mL. Le provette sono state ultracentrifugate a 4000 giri/min. Successivamente, l'*n*-esano presente nel campione è stato rimosso, e la fase di acetonitrile rimanente è stata mandata purificata. Una colonna MCS a scambio cationico per l'estrazione in fase solida (SPE) è stata attivata con acetonitrile (5 mL) per ogni campione; quindi, la fase acetonitrile è stata applicata alla colonna SPE. Quando il campione è stato eluito per gravità, la colonna è stata lavata con acetonitrile (3 mL), seguito da acqua deionizzata (3 mL) e quindi da metanolo (3 mL). È stato applicato il vuoto e le cartucce sono state asciugate per 2 minuti. Gli analiti sono stati eluiti in una singola fiala con una miscela di metanolo e ammonio (5:95, 4 mL) e quindi essiccati sotto azoto a 50 °C. Infine, gli analiti sono stati risospesi in metanolo fino a un volume di 0,2 mL e sono stati trasferiti in fiale per autocampionatore e analizzati con il sistema GC-MS.

I campioni di acqua sono stati estratti con cartucce OASIS™ HLB secondo il metodo di Duarte et al. (2023), eseguendo da una fase di lavaggio con 5 mL di metanolo: acqua (10:90) e da un'eluizione finale con 6 mL di metanolo, quindi essiccati sotto azoto a 50 °C. Infine, gli analiti sono stati disciolti in metanolo fino ad un volume di 0,2 mL e sono stati trasferiti in fiale autocampionatrici e analizzati con il sistema GC-MS.

Il bioaccumulo dei contaminanti nell'organismo acquatico è stato indicato dal fattore di bioconcentrazione (BCF), che identifica il rapporto tra le concentrazioni di contaminanti

nell'organismo acquatico e nell'acqua (Costanza et al., 2012). È stato espresso in L/kg come rapporto tra la concentrazione di Cpz nei tessuti molli dei mitili e nell'acqua in condizioni di stato stazionario (Davies e Dobbs, 1984; del Carmen Gómez-Regalado et al., 2023). Il metodo GC/MS è stato eseguito utilizzando un cromatografo Shimadzu Gad GC-2010 Plus accoppiato al GCMS- TQ8030. La colonna analitica colonna analitica era una HP-5 MS (30 m × 0.25 mm; spessore del film 0.25 mm). La porta dell'iniettore è stata impostata a 280 °C. Le condizioni di temperatura erano le seguenti: temperatura iniziale di 120 °C per 1 min, aumentata a 290 °C con un aumento di 10 °C/min, mantenuta per 2 minuti, per un tempo totale di 19 minuti. Il flusso di gas di trasporto (elio) è stato mantenuto a 1,0 mL/min in modalità a flusso costante. Il GC/MS è stato programmato per eseguire un'iniezione splitless. Il volume di iniezione era di 1 µL. Lo spettrometro di massa (TQ8030) era a sorgente ionica a impatto di elettroni (EI). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in modalità ioni positivi. La temperatura della sorgente è stata impostata a 230 °C e l'energia a 70 eV. La porta dell'iniettore è stata impostata a 280 °C. La tensione del moltiplicatore è stata impostata a 150 V e il ritardo del solvente è stato impostato a 12 minuti. Gli ioni monitorati (m/z) per l'analisi quantitativa sono stati 318 e quattro ioni 320, 272, 232 e 86 sono stati utilizzati per l'identificazione della clorpromazina, acquisiti in modalità SIM.

3.6.2.3. *Markers di biotrasformazione e tossicità*

Per la valutazione della biotrasformazione degli xenobiotici, è stato preparato un surnatante di 6.00 g di tessuto della ghiandola digestiva. I campioni sono stati omogeneizzati (10 % p/v) in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,4, contenente 100 mM KCl e 1 mM EDTA, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM 0,1 mM di fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) per l'inibizione della proteolisi. Gli omogenati sono stati centrifugati a 6000 g per 10 minuti e il surnatante risultante è stato conservato a -40 °C. La concentrazione proteica è stata analizzata nel surnatante secondo il metodo di Lowry et al., (1951), utilizzando la sieralbumina bovina come standard proteico. sieralbumina bovina come standard proteico. Le attività degli enzimi sono state indicate a 25 °C. I valori di assorbanza sono stati misurati su uno spettrofotometro UV/Vis spettrofotometro ULAB 102UV.

L'attività del citocromo P450 (CYP450) legata alla 7-etossi resorufina O-deetilasi (EROD) è stata misurata indicando la formazione di resorufina a 572 nm (Klotz et al., 1984). L'attività EROD è stata calcolata utilizzando un coefficiente di estinzione molare di $73,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e riferita alla concentrazione di proteine solubili. L'attività della glutathione S-transferasi (GST, EC 2.5.1.18) è stata dosata spettrofotometricamente a 25 °C utilizzando come substrato il glutathione ridotto (GSH) e l'1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDBN) in 100 mM tris-HCl, pH 7,4 (Habig et al., 1974). L'aumento dell'assorbanza a 340 nm è stato registrato per 2 minuti. L'attività GST è stata calcolata utilizzando $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ed espressa come $\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ di proteina solubile. La stabilità della membrana lisosomiale (integrità lisosomiale) come indice di vitalità è stata determinata nella ghiandola digestiva mediante il saggio di ritenzione con RN nella versione spettrofotometrica (Babich e Borenfreund, 1990) adattata ai tessuti dei molluschi da Haj et al., (2019) a 550-nm ed espressa in unità relative per g di peso fresco. Abbiamo accettato che il colorante presente nel surnatante dopo la procedura di fissazione, formaldeide e congelamento del tessuto derivasse dai lisosomi instabili, mentre le cellule sane conservavano il colorante nei lisosomi (Marasinghe Wadige et al., 2014; Scerra et al., 2021).

3.6.2.4. *Attività apoptotica*

Per il saggio dell'attività della caspasi-3 (EC 3.4.22.56), è stato preparato un omogenato di tessuto al 25% con una miscela contenente il 4% di Triton X100, 8 mM EDTA, 20 mM ditiotreitolo, 150 mM NaCl, 350 µg/mL PMSF per l'inibizione delle proteasi e mantenuta in ghiaccio per 10 minuti. La miscela è stata centrifugata a 12000 g per 10 minuti e il surnatante è stato analizzato con il saggio colorimetrico basato sul clivaggio del peptide acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA) che produce un prodotto colorato p-nitroanilina (pNA) (Kaushal et al., 2014). Il rilascio di p-nitroanilina è stato registrato ogni 10 min a 405 nm ($\epsilon = 10,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) per 2 h a 25 °C ed espresso come pmol pNA min⁻¹ mg⁻¹ di proteina solubile. L'attività enzimatica della caspasi-3 è risultata lineare nell'intervallo di concentrazioni proteiche utilizzate per calcolare l'attività specifica. L'attività della catepsina D (CtD, EC 3.4.23.5) è stata determinata nell'omogenato 1:2 peso/volume di tessuto con emoglobina denaturata in acido come substrato, rilevando il prodotto solubile colorato dell'idrolisi a 280 nm (Barrett, 1977). L'attività CtD libera (CtDe, fuori dai lisosomi) è stata valutata nell'omogenato senza aggiunta di detergente, mentre l'attività CtD totale (CtDt) è stata misurata dopo il rilascio dell'enzima mediante trattamento con Triton X100. Le attività sono state determinate utilizzando un coefficiente di estinzione molare di $1490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ed espresse come nmol di tirosina per min mg⁻¹ di proteina solubile.

3.6.2.5. *Saggio delle metallotioneine*

La concentrazione della proteina metallotioneina (MTSH) è stata determinata con il metodo di Viarengo et al. (1997) nella frazione citosolica di un omogenato 1:3 peso/volume omogenato in tampone Tris-sucroso 20 mM pH 8.6 con 0.01 % β -mercaptoetanolo, 0.5 mM PMSF, 6 µM leupeptina dopo l'estrazione in etanolo/cloroformio e la diluizione in tampone Tris-HCl 5 mM, contenente 1 mM EDTA (pH 7.0), utilizzando il 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB) per la colorazione dei tioli. L'assorbanza dei campioni è stata letta a 412 nm. La concentrazione di MTSH è stata calcolata utilizzando un coefficiente di estinzione molare del 5-tio-2-nitrobenzoato di

14.150 M⁻¹ cm⁻¹ ed espressa in nmol g⁻¹ peso fresco tenendo conto delle caratteristiche molecolari della metallothioneina di *M. galloprovincialis*, il cui numero di residui di cisteina è 21 e il peso molecolare è 7066 Da. Per l'analisi delle metallothioneine metallate (legate allo Zn) (MTZn), sono state isolate come proteine termostabili mediante cromatografia di esclusione dimensionale su Sephadex G-50 come descritto in Khoma et al. (2020a) con i necessari aggiustamenti per evitare la loro ossidazione. La concentrazione di Zn è stata misurata nell'eluato digerito del pool di picchi cromatografici contenenti MTs utilizzando la reazione di complessazione di Zn (II) con 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-[N-propil-N-(3-solfopropil) amino]fenolo sale disodico diidrato (5-Br-PAPS) (Karaman e Menek, 2012) e valutata dall'assorbanza del complesso metallo-5-Br-PAPS a 550 nm. L'affidabilità delle misurazioni dello Zn è stata valutata analizzando il materiale di riferimento certificato ERM-CE 278; il recupero del metallo era compreso tra il 90% e il 110%. Il controllo di qualità è stato eseguito con il metodo dell'aggiunta di standard. La concentrazione di metallo nei MT è stata espressa come nmol/g peso fresco. La concentrazione di MT metallizzati (MTZn) è stata calcolata assumendo che ogni molecola di MT legghi sette ioni Zn nei cluster Zn-tiolati.

3.6.2.6. Valutazioni istologiche

I campioni sono stati trattati per l'analisi immunoistochimica come precedentemente descritto (Szychlinska MA, et al., 2020). In breve, dopo 14 giorni di trattamento, i tessuti molli delle cozze sono stati rimossi dai gusci e fissati in una soluzione di paraformaldeide al 10% (PFA). Dopo 24 ore, le ghiandole digestive sono state disidratate in etanolo graduato (dal 50% all'etanolo assoluto), ripulite in xilene, incorporate in paraffina e tagliate in sezioni dello spessore di 8 µm utilizzando un microtomo manuale rotante (Leica RM2235, Milano, Italia). Le sezioni istologiche montate su vetrini rivestiti di silano (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germania) sono state essiccate a 37 °C per 24 ore e colorate secondo il protocollo standard di Harris per ematossilina ed eosina (H&E). Infine, le sezioni di ghiandola digestiva colorate sono state esaminate al microscopio ottico Leica DMI 4000B (Leica Microsystems Srl, Milano, Italia) per valutare la morfologia cellulare e la presenza o meno di alterazioni morfologiche.

3.6.2.7. *Analisi del Bisso*

Per l'analisi del numero di placche bissali e della loro lunghezza, si rimanda alla metodica descritta nel paragrafo 3.4.2.3.

3.6.2.8. *Analisi statistica*

I risultati delle analisi biochimiche sono stati espressi come media $\pm$ SD. L'analisi dello Zn-MTs è stata ripetuta in quattro repliche per ciascuno dei due campioni indipendenti del gruppo, ottenendo $n = 8$ per ciascun gruppo. Per tutti gli altri tratti, la dimensione del campione era di otto individui. I dati sono stati testati per la normalità e l'omogeneità della varianza utilizzando rispettivamente il test di ShapiroWilk e il test di Levene. Quando possibile, i dati sono stati normalizzati con il metodo di trasformazione comune Box-Cox. Per testare l'effetto dei trattamenti è stata utilizzata l'ANOVA a una via, seguita da procedure post hoc. Per i dati non distribuiti normalmente, sono stati eseguiti test non parametrici (ANOVA di Kruskal-Wallis e test U di Mann-Whitney). I dati normalizzati e trasformati in Box-Cox sono stati sottoposti all'analisi delle componenti principali (PCA) per valutare le relazioni tra i parametri misurati, utilizzando il metodo di rotazione Varimax con normalizzazione Kaiser, mentre per la separazione dei gruppi esposti è stata utilizzata l'analisi discriminante canonica. Per i calcoli è stato utilizzato il software IBM SPSS Statistics versione 24 per Windows. I grafici sono stati generati utilizzando GraphPad Prism 6.

3.6.3. Risultati

3.6.3.1. Bioaccumulo di clorpromazina nei molluschi

I livelli nominali di Cpz nei campioni di acqua sperimentale e la concentrazione all'interno dei mitili sono stati espressi nella Tabella 21. Nei campioni di acqua del gruppo di controllo non è stata riscontrata la presenza di Cpz, mentre è stata riscontrata una concentrazione nominale superiore del 90% dei gruppi esposti, con differenze significative tra loro (11,28 ng/L per Cpz I e 10,93 µg/L per Cpz II). I mitili tenuti in acqua di mare priva di Cpz non hanno mostrato alcun bioaccumulo di questo contaminante. Le due concentrazioni di Cpz (Cpz I: 12 ng/L; Cpz II: 12 µg/L) sono state somministrate ai mitili per 14 giorni. Trascorso questo tempo, i mitili del gruppo esposto alla concentrazione più bassa hanno mostrato un bioaccumulo medio di 0,46 ng/g, mentre quelli esposti alla concentrazione più alta hanno mostrato un contenuto medio di Cpz di 0,61 mg/g, con una differenza significativa ($p < 0,05$) rispetto al gruppo di controllo.

Tabella 21: La concentrazione di Cpz è stata analizzata mediante GC-MS nelle acque sperimentali (mg/l) dopo 14 giorni e nelle vasche di controllo e trattate (cioè Cpz I, Cpz II) di *M. galloprovincialis*. I dati sono presentati come media $\pm$ SD di analisi in triplicato.

Campione	Gruppi testati		
	Controllo	Cpz I (12 ng/L)	Cpz II (12 µg/L)
Acqua	<LOD	11,28 $\pm$ 1,42 ^a ng/L	10,93 $\pm$ 0,50 ^b µg/L
Tessuto mitili	<LOD	0,46 $\pm$ 0,03 ^a ng/g	0,61 $\pm$ 0,07 ^b µg/g
Fattore di			
Bioconcentrazione	-	2,61	19,67
(BCF), L/Kg			

LOD = limite strumentale di rilevamento di Cpz (0,28 µg/kg); lettere apicali diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0.05$ con test HSD di Tukey post hoc).

3.6.3.2. *Attività di biotrasformazione*

L'analisi delle attività di biotrasformazione ha indicato un aumento dell'attività EROD del 31,0% nel gruppo Cpz I, mentre concentrazioni più elevate non l'hanno influenzata (Figura 27A). L'attività della GST è stata riscontrata in entrambe le esposizioni, rispettivamente del 46% e del 70% (Figura 27B). Il livello di metallotioneina rilevato con i due metodi ha dimostrato un aumento in entrambi i gruppi esposti, in particolare nella Cpz II, rispetto al controllo (Figura 27C e D). Tuttavia, nel confronto con il gruppo di controllo, il tasso di metallizzazione della metallotioneina è aumentato, mentre nel gruppo di controllo questa parte era pari al 71.6% rispetto alla concentrazione totale della proteina metallotioneina (MTSH) e nei gruppi Cpz I e Cpz II all'86,3 e 81,4%. I risultati dell'eluizione delle proteine termostabili (Figura 28) confermano la presenza del picco con peso molecolare corrispondente alla metallotioneina (circa 7 kDa) e lo spettro di assorbimento UV tipico di queste proteine, che indica la presenza di cluster metallo-tiolati. Nei gruppi esposti non sono stati rilevati segni di oligomerizzazione o di parziale ossidazione delle MT (Irvine et al. (Irvine et al., 2017) in base al profilo cromatografico (Figura 28A) e allo spettro UV (Figura 28B).

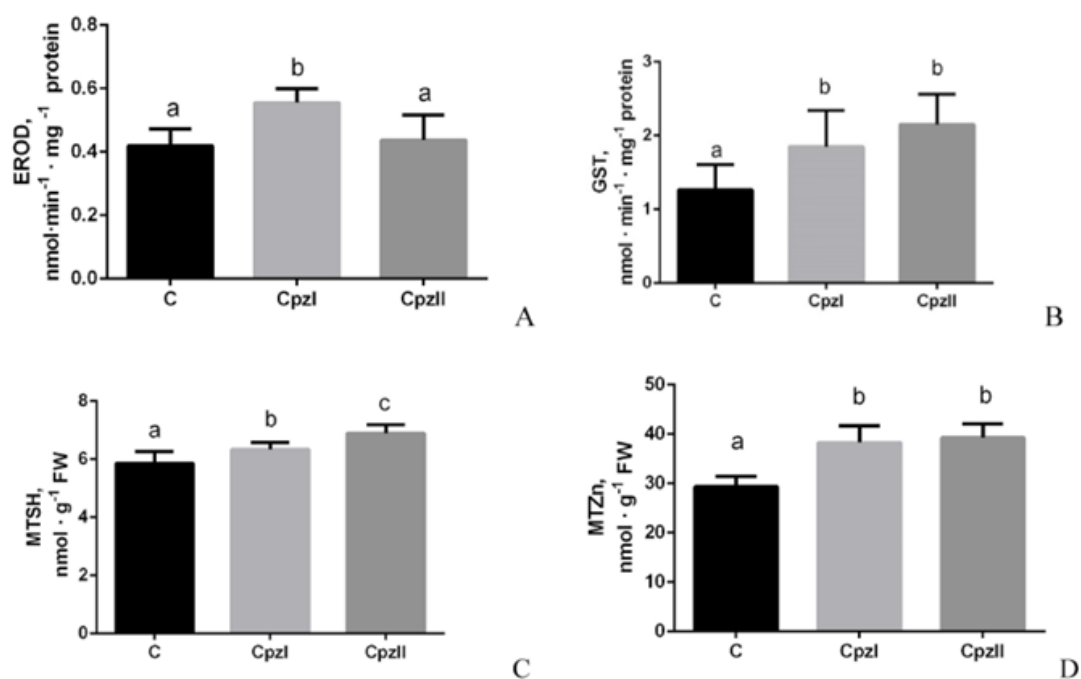


Figura 27: Gli enzimi di biotrasformazione e le risposte della metallotioneina nella ghiandola digestiva del mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis* in seguito all'esposizione a due concentrazioni di Cpz per 14 giorni: A, attività della 7-etossi resorufina O-demetilasi (EROD); B, attività della glutatione S-transferasi; C, concentrazione della proteina metallotioneina (MTSH); D, concentrazione della metallotioneina metallata (legata allo Zn) (MTZn). Gruppi: C - gruppo di controllo, Cpz I - 12 ng/L di Cpz; Cpz II - 12 di Cpz. Le lettere diverse sopra le colonne indicano differenze significative tra i gruppi, $M \pm SD$, $N=8$, $P < 0.05$. I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS Statistics for Windows, versione 24. I grafici sono stati eseguiti con GraphPad Prism 6.

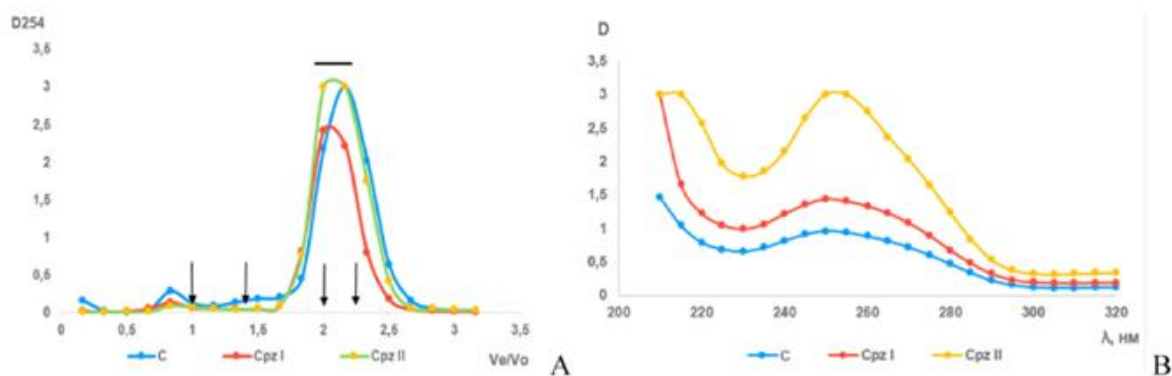


Figura 28: Rilevamento delle proteine termostabili a basso peso mediante cromatografia di esclusione dimensionale su Sephadex G-50 nella ghiandola digestiva del mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis* in seguito all'esposizione a due concentrazioni di Cpz per 14 giorni: A, profili di eluizione su Sephadex G-50, B, spettri di assorbimento UV del picco contenente metallothioneina. Commento. Le frecce (A) evidenziano il volume di eluizione dei marcatori: 25,8 kDa, 17,0 kDa, 12,3 kDa, 8,4 kDa, 3,4 kDa appropriati a 1,02; 1,6; 2,35; 2,8, 3,4 V_e/V_o ; il picco contenente metallothioneina è contrassegnato dalla barra.

3.6.3.3. Segnali di danno cellulare

Sono stati evidenziati i notevoli cambiamenti nei segnali della vitalità cellulare. L'attività della caspasi-3 citosolica non è cambiata nell'esposizione alla concentrazione più bassa, mentre nell'esposizione alla Cpz II è aumentata del 27% (Figura 29A). L'attività totale della catepsina D è aumentata di circa l'80% in entrambe le esposizioni (Figura 29B). Anche il suo efflusso dai lisosomi è aumentato del 62% in entrambe le esposizioni (Figura 29C). Inoltre, l'attività della catepsina D lisosomiale è aumentata del 90% e del 74% nei gruppi Cpz I e Cpz II rispetto al controllo. La stabilità della membrana lisosomiale è diminuita drasticamente (del 97 e 152%) secondo il test RN (Figura 29D).

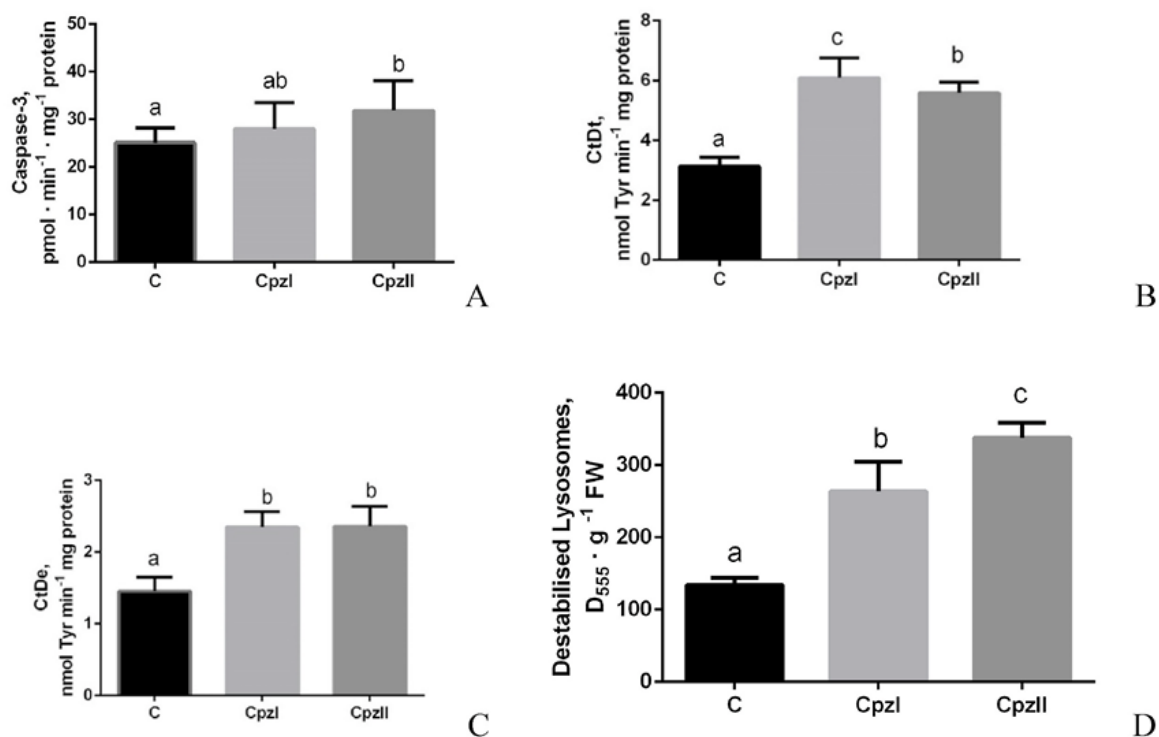


Figura 29: Attività della caspasi-3 (A), della catepsina D totale (B), della catepsina D extralisosomiale (C) e destabilizzazione dei lisosomi indicata dal test NRR (D) nella ghiandola digestiva del mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis* dopo l'esposizione a due concentrazioni di cpz per 14 giorni. Gruppi: C (gruppo di controllo), Cpz I (12 ng/L di Cpz); Cpz II (12 µg/L di Cpz). Lettere diverse sopra le colonne indicano differenze significative tra i gruppi, Media±SD, N=8, P < 0.05. I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS Statistics for Windows, versione 24. I grafici sono stati eseguiti con GraphPad Prism 6.

3.6.3.4. Segnali di alterazioni morfologiche

La colorazione H&E è stata eseguita per valutare le alterazioni morfologiche della ghiandola digestiva dopo 14 giorni di esposizione alla Clorpromazina. I nostri dati mostrano che la ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* esposta a Cpz presenta alterazioni strutturali significative all'interno delle unità alveolo-tubulari (Figura 30). Nella Figura 30A è mostrata la struttura tipica dei tubuli digestivi (dt), composti da un singolo strato di cellule epiteliali ciliate completamente arrotondate (ec) che restringono il lume. L'esposizione alla Cpz danneggia visibilmente la struttura dei tubuli digestivi: si

osservano, infatti, gravi lesioni in entrambi i gruppi trattati (Cpz I e Cpz II), sebbene siano più pronunciate nel gruppo Cpz I. Più in dettaglio, nel gruppo Cpz I, i tubuli digestivi sono degradati, le cellule epiteliali sono atrofiche e l'assetto cellulare è perduto; di conseguenza, si verifica un allargamento anomalo del lume tubulare (tl) e un assottigliamento della membrana basale delle cellule epiteliali che porta alla formazione di tubuli atrofici (at) (Figura 30B-E). Allo stesso modo, nelle ghiandole digestive del gruppo Cpz II sono state osservate lesioni locali, tubuli atrofici e fibrosi cellulare, che potrebbe essere un precursore della necrosi (Figura 30C-F). Inoltre, in entrambi i gruppi trattati sono state osservate alterazioni legate all'infiammazione, tra cui infiltrazione emocitica (hi), granulociti e "cellule brune" che ospitano accumuli di sostanze simili alla lipofuscina di colore giallo-marrone. Nel gruppo Cpz I, la proporzione di emociti nel tessuto intertubulare era maggiore (Figura 30E)

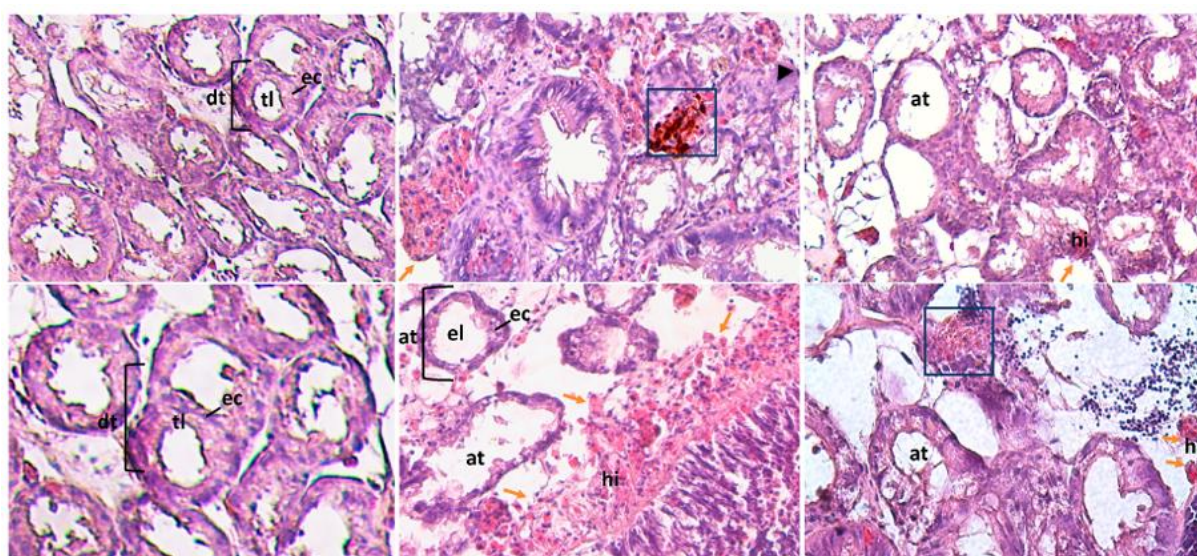


Figura 30: Immagini rappresentative della ghiandola digestiva dei mitili colorata con H&E, che mostrano le alterazioni morfologiche del gruppo di controllo (A, D), del gruppo Cpz I (Cpz 12 ng/ L; B, E) e Cpz II (Cpz 12 g/L; C, F) dopo 14 giorni di esposizione. (A, D) La configurazione tipica della ghiandola digestiva di un mitilo 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).

3.6.3.5. Alterazioni del Bisso

L'esposizione alla clorpromazina ha determinato un'alterazione del numero e della forma del bisso (Figura 31). La Tabella 22 mostra il numero di placche dopo 14 giorni di esposizione. Come si può notare, c'è stata una diminuzione significativa del numero di placche nei due gruppi esposti alla Cpz. In particolare, sembra che il gruppo esposto alla concentrazione ambientale abbia risentito maggiormente dell'esposizione ($39,5 \pm 4,95$) rispetto al gruppo esposto alla concentrazione di $12 \mu\text{g/L}$ ($49,5 \pm 6,36$). L'analisi statistica ha mostrato una significatività di $p < 0,05$ per entrambi i gruppi di esposizione rispetto al gruppo di controllo. La Tabella 23 mostra la lunghezza delle placche di bisso dopo 14 giorni di esposizione al Cpz. A differenza del loro numero, che è diminuito, la loro lunghezza è aumentata con l'aumentare della concentrazione di Cpz nelle vasche di esposizione. Rispetto al gruppo di controllo ($0,74 \pm 0,36$), i campioni esposti a 12 ng/L hanno mostrato un aumento della lunghezza delle placche dei mitili ($0,84 \pm 0,33$), anche se non significativo. Al contrario, i mitili esposti a $12 \mu\text{g/L}$ hanno mostrato una lunghezza delle placche molto maggiore ($1,43 \pm 0,46$), con una differenza significativa rispetto al gruppo di controllo, ma non rispetto al gruppo controllo.



Figura 31. Immagini rappresentative di bisso ottenute con lo stereomicroscopio AxioCam MRc 5 e acquisite con il software AxioVision AC Rel. 4.5. Mostrano i cambiamenti nella lunghezza della piastra dal gruppo di controllo (30a) ai gruppi di esposizione a Cpz I (30b) e Cpz II (30c) dopo 14 giorni di esposizione.

Tabella 22: Numero di placche bisessuali di *M. galloprovincialis* rilevate allo stereomicroscopio nei gruppi di controllo e di trattamento (12 ng/L e 12 µg/L). I dati sono presentati come media ± SD di analisi in doppio.

	Gruppi di esposizione		
	Controllo	Cpz I (12 ng/L)	Cpz II (12 µg/L)
Numero di placche bissali	105 ± 0 ^a	39,5 ± 4,95 ^b	49,5 ± 6,36 ^b

a-b: lettere apicali diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0.05$) con il test HSD post hoc di Tukey; le stesse lettere apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0.5$) con il test post hoc Tukey.

Tabella 23: Lunghezza delle placche bissali di *M. galloprovincialis* rilevate allo stereomicroscopio nei gruppi di controllo e di trattamento (12 ng/L e 12 µg/L). I dati sono presentati come media ± SD di analisi in doppio.

	Gruppi di esposizione		
	Controllo	Cpz I (12 ng/L)	Cpz II (12 µg/L)
Lunghezza delle placche bissali (mm)	0,74 ± 0,36 ^a	0,84 ± 0,33 ^{a,c}	1,43 ± 0,46 ^{b,c}

a-c: lettere apicali diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0.05$) con il test HSD post hoc di Tukey; le stesse lettere apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0.05$) con il test post hoc Tukey.

3.6.4. Discussioni

La presenza di un'ampia gamma di prodotti farmaceutici e cosmetici negli organismi acquatici sta diventando sempre più comune (Porretti et al., 2022; Zicarelli et al., 2022). Le principali fonti di immissione di prodotti farmaceutici nei sistemi acquatici sono le acque reflue domestiche, gli effluenti industriali e ospedalieri e i farmaci utilizzati nell'allevamento o nell'acquacoltura (Ravi et al., 2023). La Cpz è un importante antipsicotico appartenente al gruppo delle fenotiazine, utilizzato nel trattamento della schizofrenia, della fase maniacale del disturbo bipolare, della psicosi senile e della psicosi da farmaci. Secondo il Comitato congiunto di esperti FAO/OMS sugli additivi alimentari (JECFA), sebbene i dati sulla presenza di Cpz o dei suoi metaboliti negli alimenti siano insufficienti per rappresentare un rischio per i consumatori, sono stati identificati problemi di salute. Pertanto, le autorità devono prevenire la presenza di residui di Cpz negli alimenti (Codex Alimentarius, 2021). La valutazione del bioaccumulo e/o della bioconcentrazione come biomarcatore dell'esposizione è importante per la valutazione scientifica dei rischi che le sostanze chimiche possono comportare per l'ambiente (Arnot & Gobas, 2006; Porretti et al., 2023). L'esperienza decennale nell'analisi dell'accumulo di xenobiotici nei molluschi si è concentrata principalmente sui metalli tossici (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003; Dallinger, 2022). Al contrario, gli studi sulla capacità degli animali acquatici di accumulare farmaci sono frammentari e quasi assenti (Arnot & Gobas, 2006; Trombini et al., 2022).

In generale, la bioconcentrazione dei farmaci presente nelle acque è considerata bassa nei molluschi bivalvi rispetto a quella riscontrata nei pesci. In particolare, è stato messo a confronto il bioaccumulo di farmaci in diverse specie acquatiche, nello specifico 20 prodotti farmaceutici in coccodrillo (*Cerastodema glaucum*), conchiglia nobile (*Pinna nobilis*) e lumaca di mare (*Murex trunculus*). La ricerca in due stagioni nella laguna marina ha rilevato la presenza di 18 dei 20 composti analizzati a basse concentrazioni, ng/g, con un accumulo preferenziale di β -bloccanti e psicofarmaci nei pesci rispetto ai molluschi in gabbia (Moreno-González et al., 2016). L'accumulo maggiore nei muscoli dei pesci rispetto ai molluschi è stato confermato anche nel caso degli antibiotici nelle acque costiere della Cina, dove i livelli più alti di farmaci nel biota marino hanno raggiunto

decine di $\mu\text{g/kg}$ di peso secco (Fabbri & Franzellitti, 2016). Per alcuni prodotti farmaceutici, in particolare flumequina, ciprofloxacina e ibuprofene, i valori di BCF dopo 21 giorni di esposizione a concentrazioni piuttosto elevate, pari a $100 \mu\text{g/L}$, sono risultati entro i limiti di $0,75\text{-}0,92 \text{ L/kg}$ (Trombini et al., 2022).

Tuttavia, il confronto interspecie ha indicato che *M. galloprovincialis* ha la capacità di accumulare la sostanza idrofoba tributilstagno nei limiti del BCF di $5000\text{-}10000$ (Horiguchi et al., 1995; Cledón, 2004). La bioconcentrazione dei composti organici è il risultato della partizione tra la concentrazione dei contaminanti chimici nell'organismo acquatico e nell'acqua in condizioni di stato stazionario (Costanza et al., 2012; Davies & Dobbs, 1984) e quindi la lipofilia della sostanza può essere il fattore critico. La Cpz presenta un coefficiente di ripartizione olio-acqua K_{ow} (coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua) pari a 5.35 (Tanoue et al., 2020). La Cpz appartiene alle sostanze farmaceutiche lipofile ampiamente rilevate nei campioni di acqua superficiale e di pesce, con concentrazioni medie del totale di queste sostanze nell'intervallo di $15.4\text{-}384.5 \text{ ng/L}$ nell'acqua e di $3,0\text{-}128,4 \text{ ng/g}$ nel pesce (Liu et al., 2015), o, nelle unità di BCF, calcolate per questi limiti, 195 e 334 L/kg corrispondenti. Questi valori sono piuttosto elevati, ad esempio se confrontati con i dati relativi all'accumulo di composti farmaceuticamente attivi da parte delle vongole *Ruditapes decussatus* esposte a uno scarico di un impianto di trattamento delle acque reflue urbane (UWWTP), come riportato da Cravo et al., 2022. Le linee guida suggeriscono che, per l'analisi della bioconcentrazione, l'organismo deve essere esposto ad almeno due diverse concentrazioni della sostanza testata, il che richiede il doppio delle risorse sperimentali. Questo protocollo di "due diverse concentrazioni di esposizione" non viene regolarmente osservato nei dati esaminati (Arnot e Gobas, 2006). La nostra misurazione illustra l'importanza di tale richiesta, perché i BCF calcolati per esposizioni a due concentrazioni di Cpz erano molto diversi: $\log(\text{BCF})$ 2.61 e 19.67 , cioè entro i limiti dei valori riportati per la distribuzione di 5.317 valori unici di BCF esaminati per 822 sostanze chimiche in 186 specie acquatiche riportate in 380 fonti pubblicate tra il 1966 e il 2005, con circa il 70% dei dati generati tra il 1995 e il 2005. In questa revisione, i test sono maggiormente validi per le sostanze chimiche organiche stabili con un intervallo $\log K_{ow}$ di $1,5\text{-}6,0$, che corrisponde alla caratteristica della Cpz

(Arnot e Gobas, 2006). Nel presente studio, la giustapposizione tra la capacità di concentrare la Cpz nei tessuti dei molluschi (un marcatore di esposizione) e le risposte biochimiche (marcatori di effetto) in funzione della concentrazione ha rivelato notevoli differenze di grandezza. Mentre il bioaccumulo è aumentato di circa 13 volte per un aumento di 1000 volte della concentrazione di Cpz nei mitili, i cambiamenti nei biomarcatori di effetto sono stati di circa 2-2.5 volte per la catepsina D e l'instabilità lisosomiale. Pertanto, abbiamo riscontrato limiti relativamente bassi della risposta biologica, quando la capacità di rispondere all'eccesso di xenobiotici nell'organismo è stata inficiata. È stato riportato che i molluschi bivalvi mostrano la capacità di controllare il contenuto interno di farmaci, mantenendone costante la concentrazione durante l'esposizione e riducendone il contenuto dopo la depurazione (Trombini et al., 2022). Nel presente studio, l'analisi dei marcatori di esposizione ha indicato che la capacità dei mitili di rispondere all'eccesso di Cpz è stata soprafatta alle concentrazioni più elevate ($\mu\text{g/L}$), quando le risposte di alcuni indici, come l'EROD, non sono state modificate, a differenza di quanto è avvenuto con concentrazioni 1000 volte inferiori di Cpz. Nello studio di Duarte et al., (2023), le concentrazioni di Cpz nelle acque estuarine portoghesi variavano da un valore inferiore alla rilevabilità (LOQ, corrispondente a 1 ng/L) a 2.6 ng/L, mentre nei sette organismi analizzati (*Halobatrachus didactylus*, *Dicentrarchus labrax*, *Diplodus bellottii*, *Diplodus sargus*, *Sparus aurata*, *Platichthys flesus* e *Solea solea*) i livelli di Cpz erano sempre inferiori al LOQ (5 ng/L), sia nel muscolo che nel fegato. Questo studio conferma i nostri risultati secondo i quali la Cpz è scarsamente bioaccumulata nei tessuti degli animali marini o viene trasformato nei suoi metaboliti.

Nonostante la Cpz sia stata classificata come non biodegradabile dai batteri ambientali, un'analisi cromatografica sottile con frammentazione spettrometrica di massa ha permesso di scoprire diversi suoi prodotti di biotrasformazione (Trautwein e Kümmerer, 2012). Nei mammiferi, la biotrasformazione della Cpz è stata ampiamente studiata (Coccia e Westerfeld, 1967). Tale trasformazione avviene tramite il sistema enzimatico microsomiale epatico. Si ritiene che la sua conversione, catalizzata dagli enzimi della famiglia del citocromo P450, porti alla formazione di metaboliti reattivi con effetti collaterali rispetto al farmaco progenitore. Tra questi, si sono verificati i prodotti della

demetilazione e dell'idrossilazione, tra cui l'idrossilazione N-metilica, l'idrossilazione aromatica e l'N-dealchilazione (Xue et al., 2016 a,b). Nella cozza, l'aumento delle attività di EROD e GST indicava l'attivazione del sistema di biotrasformazione, in particolare nel gruppo Cpz I. È importante notare che la bassa concentrazione di Cpz, pari a 0,4 µg/L, corrisponde al livello di Cpz presente negli impianti di trattamento delle acque reflue (Yuan et al., 2013). Nel presente studio, l'attivazione di EROD dimostra che questo enzima può essere coinvolto nella trasformazione a basse concentrazioni di Cpz. La Cpz è risultata in grado di inibire gli enzimi di trasformazione microsomiale nel fegato umano in vitro, tuttavia, dati i valori K_i osservati, il suo potenziale di produrre un'inibizione clinicamente significativa delle isoforme del CYP450 in vivo è stato valutato come limitato (Gervasini et al., 2013).

L'attivazione della GST può essere correlata alla successiva trasformazione dei derivati della Cpz. Tuttavia, i dati relativi al coinvolgimento della GST nella trasformazione della Cpz sono contraddittori. Nell'esposizione diretta dell'enzima ai farmaci, è stata osservata l'inibizione della Cpz nei confronti della GST e di altri enzimi, il che può essere spiegato dall'interazione diretta tra la Cpz e l'enzima (Türkan et al., 2020). È stata riportata una diminuzione dell'attività della GST in *U. tumidus* esposto a 18 µg/L di Cpz per 14 giorni (Khoma et al., 2022a). Nella specie di cladocero *Daphnia magna*, esposta a concentrazioni di Cpz pari a 10 ng/L, 1 µg/L e 250 µg/L per 48 ore, l'attività della GST non è cambiata significativamente in nessuna delle tre esposizioni (Oliveira et al., 2015). In ogni caso, i nostri dati hanno dimostrato il coinvolgimento delle attività di biotrasformazione nella parziale conversione della Cpz in metaboliti, la cui efficacia o le cui conseguenze tossiche saranno ulteriormente valutate. In generale, l'attività di GST non è stata correlata con l'EROD in questo studio e in altri studi su animali acquatici provenienti da aree inquinate o esposti a varie sostanze (Domingues et al., 2010). Altri studi confermano che gli effluenti contenenti prodotti farmaceutici provenienti da ospedali psichiatrici inducono il metabolismo della fase 1 e/o della fase 2 nei molluschi bivalvi (Bonnafé et al., 2015).

L'esposizione alla Cpz ha causato un aumento del livello di metallotioneina, una proteina coinvolta nella risposta allo stress (Isani & Carpenpè, 2014; Nam & Kim, 2017; Bozhkov et

al., 2021; Sureda et al., 2011). Grazie al loro elevato numero di gruppi tiolici (29% dei residui aminoacidici totali per molecola in *M. galloprovincialis*), le metallotioneine possono essere coinvolte nella risposta antiossidante. È importante notare che i tioli legati alle metallotioneine nei molluschi hanno una reattività più elevata rispetto ai pesci, il che spiega il loro maggiore potenziale antiossidante (Vergani et al., 2005). Come dimostrato, la Cpz, nelle stesse esposizioni, ha indotto nei molluschi una risposta del glutatione (GSH), con una diminuzione dell'attività della catalasi e un'elevata perossidazione lipidica e carbonilazione proteica (Impellitteri et al., 2023a). Il confronto ha indicato che il livello di tioli legati alla metallotioneina nella ghiandola digestiva delle cozze era inferiore di circa 8 volte nel controllo e di 11 volte nelle esposizioni rispetto al livello di tioli legati al GSH. Tuttavia, questo dato può essere indicativo della risposta antiossidante delle metallotioneine contro l'impatto della Cpz. È importante notare che la capacità delle metallotioneine di catturare gli ioni idrossile è risultata 300 volte superiore a quella del GSH (Sato & Kondoh, 2002). Inoltre, la chelazione dello Zn nei loro cluster tiolati dipende dallo stato redox dei tioli (Krężel & Maret, 2016). Effetti avversi di diversa natura possono diminuire il livello di metallotioneina metallizzata nei molluschi, anche quando il livello totale di questa proteina è aumentato (Auclair et al., 2020; Khoma et al., 2020a,b; 2021a,b). Al contrario, un livello elevato di metallotioneina metallizzata indica una risposta adattativa all'impatto stressante (Ruttkay-Nedecky et al., 2013; Martyniuk et al., 2022b). L'aumento della concentrazione totale di metallotioneina e il tasso di metallizzazione senza alterazione della funzionalità dei cluster tiolati (secondo lo spettro di assorbimento), rilevati in questo studio, possono essere spiegati dalle proprietà riduttive della Cpz nei confronti dei tioli (Tamba & O'Neill, 1991).

Il cambiamento della funzionalità tampone dello Zn delle metallotioneine può anche essere correlato all'effetto diretto della Cpz sul metabolismo dei metalli. La Cpz inibisce diversi processi dipendenti dal Ca (Choi et al., 2001; Xu et al., 2010; Hamaguchi et al., 2014). Poiché è nota l'interazione tra l'assorbimento e la segnalazione di Ca e Zn all'interno delle cellule (Bouron & Oberwinkler, 2014; Zysk et al., 2018), ci si aspettava una risposta da parte della metallotioneina. La Cpz ha provocato un elevato accumulo di Zn nelle metallotioneine e ha persino aumentato il tasso di metallizzazione delle stesse

rispetto al controllo. Lo stesso effetto è stato osservato nell'*U. tumidus* esposto a 18 µg/L di Cpz (Khoma et al., 2020b, 2022a). Le metallotioneine svolgono un ruolo critico nell'omeostasi dello Zn in varie condizioni e il loro coinvolgimento nella manifestazione della malattia psicotica è stato dimostrato da Yilmaz et al., (2023), i quali hanno riscontrato una diminuzione dei livelli di metallotioneina nei pazienti con diagnosi di schizofrenia. Pertanto, la capacità della Cpz di aumentare i livelli di metallotioneina e di rafforzare le loro proprietà di legame con i metalli nei molluschi può essere rilevante anche nel mondo animale.

Nei diversi modelli, compresi gli studi in vitro, è stato dimostrato che lo scambio attivo interproteico della proteina metallotioneina con gli enzimi cellulari che richiedono zinco e i fattori di trascrizione coinvolge le metallotioneine negli eventi che modulano la resistenza alla terapia con farmaci antitumorali, compresa la reattività all'infiammazione Zn-dipendente e l'attività dei fattori di trascrizione (Notta & Koropatnick, 2006; Khoma et al., 2022b; Bozhkov et al., 2021). Pertanto, sembra che la funzionalità della metallotioneina in caso di esposizione a farmaci possa rappresentare un marcatore sensibile di suscettibilità. In particolare, la maggiore partecipazione delle metallotioneine all'immagazzinamento dello Zn può influenzare le attività apoptotiche e le funzioni lisosomiali a causa della diminuzione del livello di Zn labile, che è un mediatore intracellulare dell'apoptosi (Ruttkay-Nedecky et al., 2013). La diminuzione del livello di Zn labile nell'esposizione ex-vivo con il chelante dello Zn l'N,N,N',N'-Tetrakis(2 pyridylmethyl) ethylenediamine) (TPEN) ha portato all'attivazione della principale caspasi esecutiva dell'apoptosi, la caspasi-3 (Khoma et al., 2022b). La Cpz induce la caspasi-3 nella fase iniziale dell'influenza sugli eritrociti umani in seguito a un'esposizione a breve termine (fino a 120 minuti) a concentrazioni che vanno da 50 a 150 µM (Ficarra et al., 2016). L'applicazione della Cpz nella terapia antitumorale è anche motivata dalla sua capacità di indurre apoptosi (Lee et al., 2015).

Questo effetto della Cpz può, a sua volta, promuovere l'eliminazione delle cellule che presentano un danno pro-ossidativo (Impellitteri et al., 2023a). L'effetto rilevato sulla caspasi-3 è importante, in quanto è simile ai risultati di altri modelli di esposizioni alla Cpz, dato che gli eventi di iniziazione molecolare sono ampiamente conservati in tutte le

fila animali (Wronski & Brooks, 2023). Tuttavia, la relazione tra l'effetto della Cpz sugli eventi apoptotici e l'omeostasi dei metalli necessita di un'analisi più approfondita. Nel nostro studio, la caspasi-3 è stata attivata solo nel gruppo Cpz II, quando l'EROD non ha risposto. Questa relazione può riflettere l'abolizione della capacità della biotrasformazione di partecipare al metabolismo della Cpz e, di conseguenza, l'inizio degli eventi di morte cellulare indotti dalla Cpz. Le caratteristiche lisosomiali hanno risentito in modo più evidente di tutti i marcatori studiati. Entrambe le esposizioni hanno causato un aumento significativo dell'attività della catepsina D all'interno dei lisosomi e il suo efflusso, nonché una diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali con l'aumento della concentrazione di Cpz. Questi risultati indicano che, sebbene i meccanismi di disintossicazione e di risposta allo stress siano stati attivati dalle esposizioni, in particolare nel gruppo Cpz I, l'eccesso di Cpz accumulato nei tessuti ha provocato un aumento della proteolisi nei lisosomi e lesioni alle loro membrane. Il coinvolgimento della funzione lisosomiale nei meccanismi di morte cellulare è ben noto (Artal-Sanz et al., 2006; Martínez-Gómez et al., 2015). Analogamente, nell'emolinfa di *Ruditapes philippinarum* è stata osservata una riduzione significativa del 50% della stabilità della membrana lisosomiale mediante il saggio di ritenzione del RN dopo l'esposizione a concentrazioni ambientali di caffeina, ibuprofene, carbamazepina e novobiocina, come riportato da Aguirre-Martínez et al., (2013). È importante notare che, in studi precedenti dedicati all'effetto della Cpz su *M. galloprovincialis* (Impellitteri et al., 2023a), gli indici di stabilità della membrana lisosomiale delle ghiandole digestive sono risultati più sensibili rispetto agli indici degli emociti.

Nei bivalvi, la ghiandola digestiva svolge importanti funzioni non solo nel processo digestivo, ma anche nella regolazione del metabolismo, nella difesa immunitaria e nei processi di detossificazione di varie sostanze, tra cui la Cpz, che può accumularsi in questi tessuti causando marcate alterazioni istologiche (Moore & Allen, 2002). Le analisi istologiche eseguite sui tessuti delle ghiandole digestive, dopo 14 giorni di esposizione alla Cpz, hanno rivelato alterazioni atrofiche nei tubuli digestivi, evidenziate da una riduzione dello spessore epiteliale e da alterazioni dei tessuti. Queste alterazioni hanno implicato un possibile danno a tutte le funzioni essenziali delle ghiandole, come la

digestione, la regolazione omeostatica (ad esempio, la regolazione del calcio, del pH dell'emolinfa e del volume cellulare) e la difesa immunitaria (Carella et al., 2015). Inoltre, è stata rilevata anche una notevole risposta infiammatoria, come evidenziato dall'induzione dell'infiltrazione di emociti in entrambi i gruppi trattati con Cpz, anche se nel gruppo Cpz I era più evidente (de Vico & Carella, 2012; Impellitteri et al., 2022; Matozzo et al., 2016). Nei molluschi bivalvi, gli emociti sono coinvolti in diverse funzioni fisiologiche e difensive, tra cui il trasporto, l'immagazzinamento e la digestione dei nutrienti, l'immunosorveglianza dei tessuti e il processo di detossificazione, grazie al loro sistema lisosomiale altamente sviluppato (Carella et al., 2015; Multisanti et al., 2023). Pertanto, l'elevata presenza di emociti può suggerire una reazione contro lo stress ossidativo dovuto all'esposizione alla Cpz. Queste prove sono in linea con studi precedenti che collegano l'infiltrazione di emociti a gravi lesioni indotte da fattori quali neoplasie, parassitosi o xenobiotici (Sheir & Handy, 2010; Villalba et al., 2001) e con ricerche precedenti che evidenziano la suscettibilità di questo organo agli xenobiotici e ai contaminanti (Bignell et al., 2011; Marigómez et al., 2013; Pagano et al., 2022). Inoltre, la presenza di "cellule brune" associate a pigmenti simili alla lipofusina all'interno del tessuto della ghiandola digestiva, in particolare negli spazi intertubulari, suggerisce una risposta di riconoscimento, accumulo e disintossicazione dei tossici, un fenomeno precedentemente associato a organismi sottoposti a stress (Usheva & Frolova, 2006; de Vico & Carella, 2012). La lipofusina e il cerioide sono prodotti finali pigmentati derivanti dalla perossidazione dei lipidi, che si verifica all'interno delle cellule quando gli acidi grassi polinsaturi subiscono danni indotti da specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Terman et al., 1999). Nei molluschi, la loro presenza è stata associata all'esposizione a vari inquinanti (Cuevas et al., 2015; Pagano et al., 2022; Stara et al., 2021).

Le placche di bisso sono prodotte da varie specie di *Mytilus spp.* per consentire loro di ancorarsi al substrato e quindi di sopravvivere. Le variazioni della qualità dell'acqua in cui sono presenti possono influenzare la quantità di energia disponibile per l'animale, riducendo la produzione di bisso o alterando la superficie delle placche per migliorare l'adesione. Secondo Aldred et al., (2006), l'area delle placche bissali era strettamente correlata all'aumento della bagnabilità superficiale ($0,14 \text{ mm}^2$ - $0,16 \text{ mm}^2$). Nel nostro

caso, pur avendo misurato la lunghezza delle placche piuttosto che l'area, abbiamo riscontrato una tendenza simile, con un aumento della lunghezza delle singole placche in risposta alla Cpz (rispettivamente 0,74 mm, 0,84 mm e 1,43 mm). La loro abbondanza può essere influenzata anche dalla presenza di contaminanti nell'acqua, tra cui i farmaci sono i più comuni. L'esposizione a diclofenac e propanololo per 3 settimane ha portato a una diminuzione del numero di placche prodotte in *M. edulis*, soprattutto alle concentrazioni più alte (10000 µg/L) per entrambi i composti (Ericson et al., 2010). Questa tendenza è stata osservata anche con l'esposizione al nostro farmaco, anche se appartenente a una classe farmaceutica diversa, ha causato una diminuzione del numero di placche, dal controllo (105) al gruppo Cpz I (39,5) e Cpz II (49,5).

3.6.5. Conclusioni

L'importanza dei farmaci come inquinanti acquatici critici è attribuita alla loro presenza sempre più pervasiva negli ambienti, che solleva preoccupazioni riguardo alle loro potenziali ripercussioni sia sugli ecosistemi acquatici sia sul benessere umano (Lakdwala et al., 2023). Finora i residui farmaceutici sono stati tipicamente rilevati nei sistemi acquatici in un intervallo compreso tra ng/L e µg/L, ma questo studio ha dimostrato la loro capacità di esercitare effetti dannosi sulla salute dei bivalvi anche a concentrazioni significativamente inferiori. Per la prima volta è stata valutata l'entità dell'accumulo di Cpz nei tessuti del mollusco marino bioindicatore più utilizzato, il *M. galloprovincialis*. Nonostante l'attivazione degli enzimi di biotrasformazione durante l'esposizione, le attività delle proteasi citosoliche (caspasi-3) e lisosomiali (catepsina D), associate all'apoptosi, sono aumentate e l'efflusso di catepsina D dai lisosomi è aumentato proporzionalmente all'impatto della Cpz, indicando la vulnerabilità delle membrane lisosomiali. Sono state coinvolte nella risposta alla Cpz la preziosa rappresentante del tioloma cellulare, la metallotioneina, che funge da tampone per lo Zn, e la proteina metallotioneina. Di conseguenza, abbiamo osservato una modulazione della risposta specifica alla Cpz concentrazione-dipendente e un'amplificazione del danno con l'aumento della concentrazione di Cpz.

3.7. Effetti dell'ACE inibitore Enalapril su *Mytilus galloprovincialis*: Approfondimenti sulle risposte morfologiche e funzionali

3.7.1. Premesse

Il rilascio di farmaci negli ambienti acquatici, a seguito di scarichi di industrie, ospedali e acque reflue domestiche, rappresenta un rischio significativo per l'intero ecosistema (Almeida et al., 2021; Godoy et al., 2015; Maculewicz et al., 2022; Madikizela et al., 2020; Mezzelani & Regoli, 2022; Pereira et al., 2015; Santos et al., 2010). Progettati per stimolare una risposta nell'uomo e negli animali a basse dosi, i farmaci possono mettere a repentaglio la salute degli organismi acquatici non bersaglio. Particolare attenzione è rivolta alla classe dei farmaci antipertensivi, ossia β -bloccanti, diuretici, inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), bloccanti o antagonisti del recettore dell'angiotensina II (ARB) e calcio-antagonisti, la cui produzione e il cui consumo stanno progressivamente aumentando in parallelo all'aumento delle malattie cardiovascolari. Si ritiene che la contaminazione ambientale dovuta a questi farmaci sia destinata a peggiorare nel prossimo futuro, anche a causa della loro incompleta rimozione dagli impianti di depurazione e della loro relativa persistenza nelle matrici idriche (Godoy et al., 2015; Porretti et al., 2022). Nonostante la consapevolezza che gli antipertensivi siano contaminanti emergenti delle acque, ad oggi solo pochi studi hanno analizzato l'impatto che questi farmaci hanno sulla salute degli animali acquatici. Gli studi, incentrati principalmente sui β -bloccanti, forniscono prove convincenti della loro influenza negativa sulla crescita, sulla funzione degli organi e sulla sopravvivenza degli animali (Franzellitti et al., 2011; Owen et al., 2009; Parrott & Balakrishnan, 2017; Ping et al., 2022; Zhang et al., 2020).

Tra i farmaci antipertensivi, gli ACE-inibitori sono ampiamente utilizzati per il trattamento farmacologico dell'ipertensione e di altre gravi patologie cardiovascolari, come l'insufficienza cardiaca congestizia e l'infarto del miocardio (Doyle et al., 1998). Tra gli ACE-inibitori più comunemente prescritti troviamo ramipril (nome commerciale: Altace), captopril (Capoten), quinapril (Accupril), fosinopril (Monopril), lisinopril (Prinivil, Zestril)

ed enalapril (Vasotec). Sono stati studiati come contaminanti dell'acqua. Studi sui teleostei dimostrano che il ramipril influisce sulla lunghezza del corpo delle larve di pesce zebra (Matijević et al., 2023) e il captopril influisce sull'omeostasi ossidativa del *Cyprinus carpio* (Cortes-Diaz et al., 2017).

L'enalapril è stato frequentemente rilevato in campioni ambientali a causa della sua ampia diffusione nella terapia cardiovascolare (Godoy et al., 2015). È stato riscontrato che diverse fonti idriche contengono questo farmaco a concentrazioni comprese tra 40 e 136 ng/L nelle acque reflue in entrata (Hawash et al., 2023), circa 5 ng/L nelle acque reflue in uscita (Hawash et al., 2023) e tra 0.67 e 1.05 ng/L nelle acque dolci (López-Serna et al., 2012). Inoltre, a differenza di altri farmaci con emivita breve nell'ambiente, l'enalapril è stato riscontrato come stabile nell'acqua per lunghi periodi di tempo (ad esempio, 56 giorni a 25 °C e 91 giorni a 4 °C (Zuccato et al., 2005). Date le premesse, non si può escludere un possibile effetto su organismi acquatici non bersaglio.

L'enalapril è stato frequentemente rilevato in campioni ambientali a causa del suo ampio uso nella terapia cardiovascolare (Godoy et al., 2015). È stato riscontrato che diverse fonti idriche contengono questo farmaco a concentrazioni comprese tra 40 e 136 ng/L nelle acque reflue in ingresso (Hawash et al., 2023), circa 5 ng/L nelle acque reflue in uscita (Hawash et al., 2023) e tra 0.67 e 1.05 ng/L nelle acque dolci (López-Serna et al., 2012). Inoltre, a differenza di altri farmaci con emivita ambientale breve, l'enalapril è stabile in acqua per lunghi periodi [ad esempio 56 giorni a 25 °C e 91 giorni a 4 °C: (Zuccato et al., 2005)]. Pertanto, non si può escludere un suo possibile effetto sull'ambiente acquatico. Sulla base di queste premesse, il presente studio è stato concepito per analizzare i potenziali effetti dell'enalapril sugli animali acquatici, utilizzando *Mytilus galloprovincialis* come modello sperimentale. Lo stile di vita sessile e filtrante, insieme alla capacità di accumulare e tollerare xenobiotici nei tessuti (Houlihan et al., 1991; Torre et al., 2013b), rende questo mollusco un utile bioindicatore dell'inquinamento marino e un prezioso strumento per rilevare, a livello molecolare, cellulare, tissutale e d'organo, gli effetti dell'inquinamento ambientale (Capillo et al., 2018). Poiché il *Mytilus galloprovincialis* è un mollusco bivalve commestibile ampiamente utilizzato nella dieta

umana, ciò riveste particolare importanza anche per la salute pubblica e per il settore dell'acquacoltura.

I mitili sono stati esposti a due concentrazioni di enalapril in acqua (0.6 ng/L, come riportato da López-Serna et al., 2012; e 600 ng/L, x1000 volte), e sono stati utilizzati diversi approcci sperimentali per analizzare:

- il bioaccumulo di enalapril nell'intero organismo,
- la vitalità cellulare su emociti e GD,
- la regolazione del volume cellulare, lo stress ossidativo, la morfologia e i biomarcatori tissutali, la morfologia e la localizzazione dei biomarcatori tissutali.

Particolare attenzione è stata rivolta alla GD. È costituita da uno stomaco, da dotti e da numerosi tubuli epiteliali a terminazione cieca, che contengono cellule secretorie basofile e cellule digestive caratterizzate da abbondanti lisosomi acidofili. Questi organelli sono coinvolti nella risposta antiossidante agli inquinanti ambientali (Faggio et al., 2016) e rappresentano una sede di sequestro e detossificazione di metalli tossici, inquinanti organici e biologici (Marigo et al., 2002; Pagano et al., 2017). Il suo ruolo nell'accumulo di contaminanti e nel metabolismo degli xenobiotici è stato riconosciuto (Cappello et al., 2018; Faggio et al., 2018). Inoltre, è considerato uno “strumento di allerta precoce” per gli effetti biologici avversi mediati da xenobiotici (Domouhtsidou e Dimitriadis, 2001; Faggio et al., 2018; Zorita et al., 2007).

L'attività di ricerca ha contribuito alla pubblicazione di un articolo su rivista indicizzata del quale si riportano le informazioni fondamentali, figure e tabelle (Figura 32).



The effects of ACE inhibitor Enalapril on *Mytilus galloprovincialis*: Insights into morphological and functional responses

Mariacristina Filice^{1,a,*}, Alessia Caferro^{1,a}, Daniela Amelio^{a,1}, Federica Impellitteri^{b,1}, Maria Assunta Iovine^c, Miriam Porretti^d, Caterina Faggio^{c,d}, Alfonsina Gattuso^{a,*}, Maria Carmela Cerra^{a,1}, Sandra Imbrogno^{a,1}

^a Dept of Biology, Ecology and Earth Science, University of Calabria, Rende (CS), Italy

^b Dept of Veterinary Sciences, University of Messina, Messina, Italy

^c Dept of Ecosustainable Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Naples, Italy

^d Dept of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy

Figura 32: Filice et al., 2024.

3.7.1. La presenza di farmaci cardiaci nel mercato e nell'ambiente

Tra i farmaci più venduti, nel 2024 si ritrovano le specialità per il sistema cardiovascolare, che siano farmaci con o senza l'obbligo di ricetta. Questa categoria di farmaci presenta un giro d'affari di oltre 155 miliardi di dollari, destinato a crescere di oltre il 3%, arrivando nel 2029 a oltre i 180 miliardi di dollari (Figura 33).

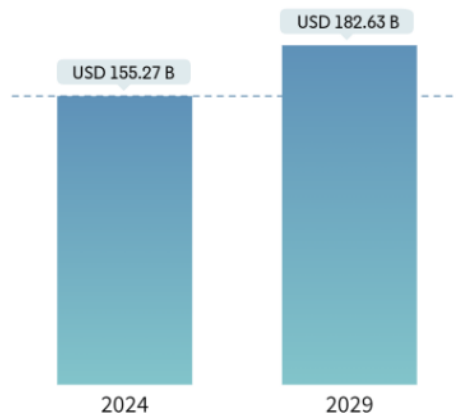


Figura 33: Grandezza e stima di mercato nella vendita di farmaci cardiovascolari tra il 2024 e il 2029 (Mordor Intelligence).

La pandemia di COVID-19 ha avuto un impatto significativo sui sistemi sanitari globali, interrompendo le cure standard in numerose strutture sanitarie ed esponendo i pazienti con malattie cardiovascolari a rischi maggiori. Tuttavia, durante la pandemia, la domanda di farmaci cardiovascolari è aumentata a causa del rischio elevato di infezioni da malattie cardiovascolari (CVD). Studi vari hanno indicato l'efficacia dei farmaci cardiovascolari nei pazienti affetti da COVID-19. La relazione tra COVID-19 e farmaci cardiovascolari è cruciale poiché i pazienti con maggiore probabilità di contrarre SARS-CoV-2 possono beneficiare di farmaci cardiovascolari che riducono il danno cardiovascolare indotto da COVID-19. Inoltre, farmaci come gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACEI) e i bloccanti del recettore dell'angiotensina II (ARB) possono influenzare direttamente la patologia del COVID-19, contribuendo a mitigare il danno cardiovascolare associato all'infezione.

Il Nord America detiene una quota significativa del mercato dei farmaci cardiovascolari, con previsioni che indicano un proseguimento della tendenza di crescita per l'intero periodo di previsione. I principali fattori che contribuiscono alla crescita della regione includono uno stile di vita sedentario, la carenza di attività fisica, una dieta inadeguata, ansia e stress, che conducono a patologie come diabete e obesità. Queste condizioni favoriscono l'aumento della prevalenza di numerose malattie cardiovascolari, tra cui la malattia coronarica, l'ictus e la fibrillazione atriale, tra le altre (Figura 34).

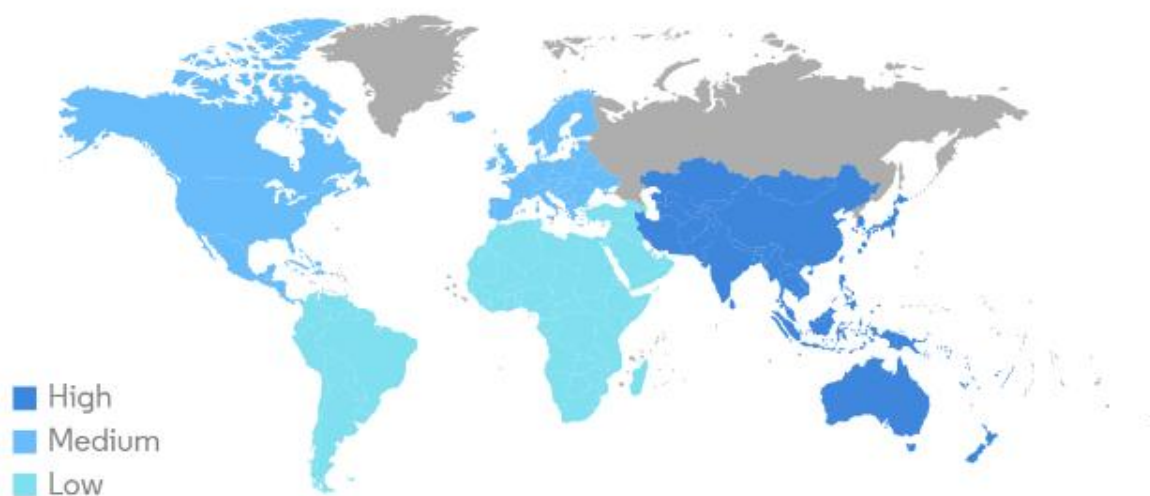


Figura 34: Mercato dei farmaci cardiovascolari: tasso di crescita per regione (Mordor Intelligence)

L'ingente uso di farmaci in generale ha determinato la sua presenza nelle acque di tutto il mondo (Halling-Sorensen et al., 1998). La presenza di farmaci e dei loro metaboliti nelle acque superficiali e nei sedimenti acquatici sono stati oggetto di numerosi studi (Bartelt-Hunt et al., 2009; Nilsen, 2007; Vazquez-Roig et al., 2010). Diversi studi hanno esaminato anche la presenza e la distribuzione di farmaci nei suoli irrigati con acqua di recupero (Gielen et al., 2009; Kinney, 2006; Ternes et al., 2007) e nei suoli che hanno ricevuto biosolidi da impianti di trattamento delle acque reflue urbane (Carbonell et al., 2009; Lapen et al., 2008). Questi studi hanno dimostrato come i trattamenti delle acque reflue non sono sufficientemente efficaci nel rimuovere questi microinquinanti, permettendo loro di entrare nell'ambiente. Una volta nell'ambiente, i composti farmacologicamente attivi possono avere effetti sugli organismi acquatici e terrestri, in particolare su quelli acquatici esposti a un afflusso continuo e a lungo termine di effluenti di acque reflue. Questo fenomeno è stato documentato in numerosi studi (Cleuvers, 2004; Nentwig et al., 2004; Schnell et al., 2009). Il lavoro di Jelic et al., (2011) ha analizzato la presenza, distribuzione e rimozione dei farmaci nelle acque reflue, rilevando oltre 43 composti, tra cui anche ACE-inibitori, con concentrazioni che andavano dai nanogrammi ai microgrammi per litro. Nagarnaik et al., 2014 ha analizzato le concentrazioni dei farmaci cardiovascolari nelle acque reflue provenienti da strutture sanitarie. Lo studio ha esaminato sedici principi attivi farmaceutici cardiovascolari (API) e due metaboliti di API cardiovascolari nei reflui. I risultati hanno mostrato che ogni API cardiovascolare è stata rilevata almeno in una delle strutture sanitarie, con il maggior numero di composti rilevati nei reflui ospedalieri. Nello specifico, l'enalapril è stato rilevato nei reflui delle strutture sanitarie con una concentrazione massima media di 2,6 ng/L nella struttura ospedaliera. Nello studio di Jauković et al., 2014, sono stati analizzati gli effluenti di due impianti di trattamento delle acque reflue (WWTP) in Serbia, rilevando come gli impianti di filtrazione non siano sempre efficienti. In quanto su 8 farmaci, solamente la atorvastatina sia stata filtrata totalmente, mentre altri composti, hanno avuto tassi di rimozione tra il 12-20% (metoprololo) e 50/80% (enalapril).

3.7.2. Materiali e Metodi

3.7.2.1. Animali

Gli esemplari di *Mytilus galloprovincialis* (lunghezza: $4,6 \pm 0,38$ cm; peso: $8,2 \pm 2,1$ g) sono stati ottenuti dalla FARAU SRL Frutti di Mare (Lago di Faro, Messina, Italia), un'azienda rinomata per la molluschicoltura, secondo le linee guida della Direttiva 2010/63/UE sulla sperimentazione animale. Il lago di Faro è un lago costiero di acqua salata con un'elevata salinità dovuta al naturale mescolamento di acqua marina proveniente dai mari Ionio e Tirreno. Le fasi di acclimatazione e di sperimentazione sono state effettuate utilizzando acqua di lago filtrata e aerata, con una salinità specifica pari a $3,4 \pm 0,02\%$, un pH pari a $7,6 \pm 0,01$ e una temperatura pari a $16,77 \pm 0,09$ °C, tutte le variabili ottenute dalla stessa azienda. Le cozze sono state distribuite in modo casuale in sei vasche (25 cozze per vasca, con 20 L di acqua) e sono state sottoposte a un ciclo di acclimatazione della durata di una settimana a una temperatura di 18 ± 1 °C, con un ciclo luce-buio di 12:12. Al termine del periodo di acclimatazione, è stato creato un gruppo di controllo e due gruppi di trattamento. Le cozze sono state esposte a Enalapril (sale di Enalapril maleato, CAS n. 75847-73-3, Alfa Aesar) per 10 giorni, come segue:

- Ctrl: Enalapril 0 ng/L;
- E1: Enalapril 0,6 ng/L;
- E2: Enalapril 600 ng/L.

Il volume totale dell'acqua di ogni vasca è stato rinnovato ogni 48 ore. Salinità, pH e temperatura sono stati misurati prima e dopo il cambio dell'acqua. Le cozze non sono state alimentate con cibo commerciale, in quanto l'acqua utilizzata per l'esperimento era acqua dolce di lago contenente alghe naturali.

3.7.2.2. Bioaccumulo

L'estrazione dell'enalapril è stata eseguita su un gruppo di 10 animali, selezionati a caso da ciascun gruppo sperimentale (CTRL, E1, E2). Ogni campione è stato sottoposto a omogeneizzazione e l'estrazione è stata eseguita secondo il metodo descritto da Valdés et al., (2014). In breve, 1 g di campione da ciascun pool è stato posto in una provetta Falcon da 50 mL e addizionato con 10 mL di metanolo (Sigma-Aldrich). La miscela è stata omogeneizzata e poi sono stati aggiunti 10 mL di HCl 0.05 M (Sigma-Aldrich) e il tutto è stato nuovamente mescolato per ottenere un'omogeneizzazione ottimale. Il surnatante è stato separato mediante centrifugazione a 3000 g per 15 minuti. La procedura è stata ripetuta più volte fino a ottenere la massima quantità di composto. Il metanolo è stato quindi evaporato a secco con un rotavapor (Buchi V700, BUCHI labortechnik AG). Il pH è stato regolato a 6 aggiungendo NaOH 1M (Sigma-Aldrich) e i lipidi precipitati sono stati separati mediante centrifugazione a 3000 g per 20 minuti. Il surnatante è stato trasferito in bottiglie di vetro e diluito con acqua ultrapura fino a un volume finale di 100 mL. Le cartucce Strata-X® Solid Phase Extraction (SPE) (500 mg/6 mL) (Phenomenex) sono state preconizionate con 10 mL di metanolo seguiti da 10 mL di acqua ultrapura, a una velocità di flusso di 1 mL/min. Successivamente, sono stati aggiunti 100 mL di campione a una velocità di flusso di 5 mL/min. Infine, le cartucce sono state risciacquate con 6 mL di acqua ultrapura e asciugate all'aria sottovuoto per 20 minuti. Gli analiti sono stati quindi eluiti con 10 mL di metanolo di grado HPLC. Questa procedura è stata ripetuta due volte e gli eluati ottenuti con entrambe le cartucce sono stati combinati. Gli eluati sono stati poi asciugati con una leggera corrente di azoto e ricostituiti con 1 mL di metanolo e con 1 mL di metanolo e acqua ultrapura (15:85 v/v). I campioni ricostituiti sono stati analizzati mediante HPLC-ESI-MS/MS.

L'analisi HPLC-ESI-MS/MS è stata eseguita su apparecchiature LC (sistema Prominence UFLC XR, Shimadzu). La strumentazione comprendeva un controllore (CBM-20A), pompe binarie (LC-20AD-XR), un degassatore (DGU20A3R), un forno per colonne (CTO-20AC) e un autocampionatore (SIL-20A XR). La separazione degli analiti è stata effettuata su una colonna a fase inversa (3.0 × 50 mm, 1.8 µm, Zorbax Eclipse C18 XDB, Agilent) riscaldata

a 40 °C. Le fasi mobili binarie utilizzate sono state: A (acido formico 0,1% o acetato di ammonio 4 mM in acqua) e B (metanolo). Il volume di iniezione è stato di 40 µL e la velocità di flusso è stata mantenuta a 0.2 mL/min.

3.7.2.3. *Analisi del Bisso*

Per la conta e l'analisi delle placche bissali, si rimanda alla metodica riportata nel paragrafo 3.4.2.3. Dopo l'esposizione all'enalapril per 10 giorni, il bisso è stato tagliato delicatamente vicino alla conchiglia e la valutazione è stata effettuata utilizzando la camera AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.), con immagini acquisite tramite il software AxioVision AC Rel. 4.5.

3.2.7.4. *Raccolta dei campioni di emolinfa, dissezione delle cozze, valutazione della vitalità cellulare di emociti e ghiandola digestiva e meccanismo di regolazione del volume*

Per l'analisi della vitalità cellulare e del meccanismo di regolazione del volume cellulare, si rimanda alle metodiche descritte nei paragrafi 3.1.2.2., 3.1.2.6. e 3.1.2.7.

3.2.7.5. *Osservazioni istologiche e di immunofluorescenza*

Sono stati utilizzati campioni (n=3 per ogni condizione sperimentale: CTRL, E1, E2) di GD, che sono stati lavati in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) e fissati in una soluzione di metanolo-acetone-acqua (MAW=2:2:1), disidratati in etanolo graduato, ripuliti in xilene e incorporati in Paraplast (Sigma-Aldrich). Successivamente, i campioni sono stati sezionati in serie a 8 µm. Le sezioni decerate sono state colorate con Ematossilina/Eosina (HE) per l'osservazione generale dei tessuti. Per l'immunofluorescenza, le sezioni parallele sono state risciacquate in soluzione salina tamponata con Tris (TBS) e incubate con l'1,5% di sieroalbumina bovina (BSA) in TBS per 1 ora. Quindi, sono state incubate per una notte a 4 °C con anticorpi policlonali di topo e capra diretti contro la proteina dello shock termico 90 (HSP90) e 70 (HSP70), rispettivamente (cat. sc13119; cat. sc1060, Santa Cruz Biotechnology, 1:50). Per la

rilevazione del segnale, dopo il lavaggio in TBS, i vetrini sono stati incubati con IgG coniugate con FITC anti-topo e anti-capra (Sigma-Aldrich, 1:100) e montati con un mezzo di montaggio (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame). I controlli negativi sono stati ottenuti su sezioni parallele trattate nello stesso modo, escludendo l'anticorpo primario. Per una migliore visualizzazione del tessuto, nelle stesse sezioni i nuclei sono stati controcolorati con ioduro di propidio (cat. P4170; Sigma-Aldrich). Le sezioni sono state osservate al microscopio ottico e a fluorescenza (Axioscope, Zeiss) e le immagini sono state digitalizzate con una fotocamera (Axiocam Zeiss).

Dopo l'isolamento e la conservazione in RNALater™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), le GD dei mitili di controllo e di quelli trattati (N=5 per ogni condizione) sono state trattate per l'estrazione delle proteine con il protocollo AllPrep DNA/RNA/Protein minikit (Qiagen S.r.l., Milano, Italia) e i reagenti, secondo le istruzioni del produttore. Il pellet di proteine ottenuto è stato solubilizzato in SDS al 5%, integrato con tampone Laemmli 2X, e caricato su gel di SDS-poliacrilammide. Successivamente, i blot sono stati incubati per una notte a 4 °C con i seguenti anticorpi disponibili in commercio: HSP90 α/β (diluizione 1:500), HSP70 (K-20) (diluizione 1:500) e l'anticorpo β -actina (cat# SC-69879; diluizione 1:2000) è stato usato come controllo di carico. Tutti gli anticorpi sono stati prodotti dalla Santa Cruz Biotechnology Inc. L'immunodetezione è stata eseguita utilizzando anticorpi secondari legati alla perossidasi e un kit di chemiluminescenza potenziata (LIGHTWave Plus, GVS Filter Technology, Bologna, Italia). Le immagini del blot sono state scansionate per ottenere unità densitometriche arbitrarie e l'analisi quantitativa è stata eseguita utilizzando il software ImageJ. I risultati sono stati espressi come medie $\pm$ SE dei valori assoluti.

3.2.7.6. *Markers di ossidazioni, attività di enzimi antiossidanti, di perossidazione lipidica e di proteine ossidativamente modificate*

Per l'analisi dei markers di ossidazione, dell'attività degli enzimi antiossidanti, di perossidazione lipidica e delle proteine ossidativamente modificate si rimanda alle metodiche descritte nel paragrafo 3.1.2.8.

3.2.7.7. *Analisi Statistica*

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism, versione 10.0 (GraphPad Software Inc.). La vitalità delle cellule di GD ed emolinfatiche è espressa come percentuale della media $\pm$ SE. Tutti gli altri valori sono espressi come medie $\pm$ SE dei valori assoluti; la significatività statistica è stata attribuita ai dati con $p < 0,05$. La distribuzione normale è stata verificata con il test di Shapiro-Wilk e, in seguito, i dati sono stati elaborati con un'ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Tukey per i confronti multipli tra i gruppi di trattamento e di controllo.

3.2.8.4. Bioaccumulo

3.2.8.5. *Alterazione del Bisso*

209

Tabella 24: Numero di placche bissali di *M. galloprovincialis* nei campioni di controllo e di Enalapril trattati (0,6 ng/L e 600 ng/L).

	Tempo	Controllo	E1 (0.6 ng/L)	E2 (600 ng/L)
Numero di				
placche	10 giorni	95 ± 9,7 ^a	78 ± 18 ^a	102 ± 16 ^a
bissali				
Lunghezza				
delle placche	10 giorni	1,43 ± 0,4 ^a	1,39 ± 0,2 ^a	1,35 ± 0,3 ^a
bissali (mm)				

I dati sono la media ± SD di analisi in doppio. a-b: le lettere apici diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$) con il post hoc Tukey test; le stesse lettere apici nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0,05$) con il post hoc Tukey test.

3.2.8.6. Valutazione della vitalità cellulare

Dopo 10 giorni di esposizione all'Enalapril a concentrazioni di 0.6 ng/L (E1) e 600 ng/L (E2), la vitalità delle cellule della GD e degli emociti è stata valutata utilizzando i metodi di esclusione della TB e di ritenzione NR. I risultati hanno mostrato un'elevata vitalità in tutti i gruppi di mitili, con poche variazioni tra i campioni di controllo e quelli trattati. Come mostrato nella Tabella 25, nelle cellule di GD, il metodo di esclusione della TB ha rivelato una vitalità del 99,2% ± 0,6 (CTRL), 98,9% ± 0,7 (E1) e 98,9% ± 0,7 (E2). Analogamente, il saggio NR ha mostrato una vitalità del 99,1% ± 0,3 (CTRL), del 99% ± 0,6 (E1) e del 98,8% ± 0,6 (E2). Una tendenza simile è stata osservata negli emociti, con il metodo di esclusione della TB che ha rivelato una vitalità del 98% ± 0,6 (CTRL), 96,6% ± 0,7 (E1) e 97,7% ± 0,4 (E2). Anche con il saggio NR è stata osservata una vitalità del 98,5% ± 1,4 (CTRL), 97% ± 2,4 (E1) e 97% ± 2,5 (E2) (Tabella 25). L'analisi statistica ha rivelato che, per entrambi i dosaggi, non ci sono differenze significative tra il gruppo di controllo e quello esposto all'enalapril ($p > 0,05$).

Tabella 25: Vitalità delle cellule della GD ed emolinfa di *M. galloprovincialis* dei gruppi di controllo e trattati con Enalapril (E1, E2) dopo 10 giorni di esposizione. TB: metodo di esclusione del Trypan Blue; RN: saggio di ritenzione del Rosso Neutro.

Tessuto	Colorazione	Gruppi testati		
		Controllo	E1 (0.6 ng/L)	E2 (600 ng/L)
Cellule della GD	TB	99,2% ± 0,6 ^a	98,9% ± 0,7 ^a	98,9% ± 0,7 ^a
	RN	99,1% ± 0,3 ^a	99% ± 0,6 ^a	98,8% ± 0,6 ^a
Cellule dell'emolinfa	TB	98,0% ± 0,6 ^a	96,6% ± 0,7 ^a	97,7% ± 0,4 ^a
	RN	98,5% ± 1,4 ^a	97,0% ± 2,4 ^a	97,0% ± 2,5 ^a

I risultati sono espressi come percentuale della media ± SE (n = 6). a-b: lettere apicali diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi (p<0.05) con il post hoc Tukey test; le stesse lettere apicali nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro (p>0.05) con il post hoc Tukey test.

3.2.8.7. Meccanismo di Regolazione del Volume

In condizioni fisiologiche, le cellule della GD di *M. galloprovincialis* hanno la capacità distintiva di modulare il loro volume quando sono state esposte a una soluzione ipotonica, mostrando un aumento graduale seguito da un ritorno al volume originale. Come mostrato nella Figura 36, le cellule del gruppo di controllo hanno subito un'espansione graduale del volume durante l'esposizione ipotonica, raggiungendo il massimo prima di tornare gradualmente allo stato iniziale. Al contrario, le cellule appartenenti ai gruppi E1 ed E2 hanno mostrato una risposta di rigonfiamento limitata e diversa da quella del gruppo di controllo, senza ritorno al volume iniziale. Questa capacità di regolare il volume cellulare è stata ulteriormente compromessa con l'aumento dei livelli di esposizione. In particolare, il volume finale delle cellule E1 è leggermente superiore a quello iniziale, mentre le cellule E2 hanno mostrato, al termine dell'esperimento, un volume inferiore rispetto a quello delle cellule di controllo. Il risultato del gruppo E2, caratterizzato da una contrazione anomala delle cellule, è risultato significativo dal punto di vista statistico, con p<0.01 rispetto al gruppo di controllo.

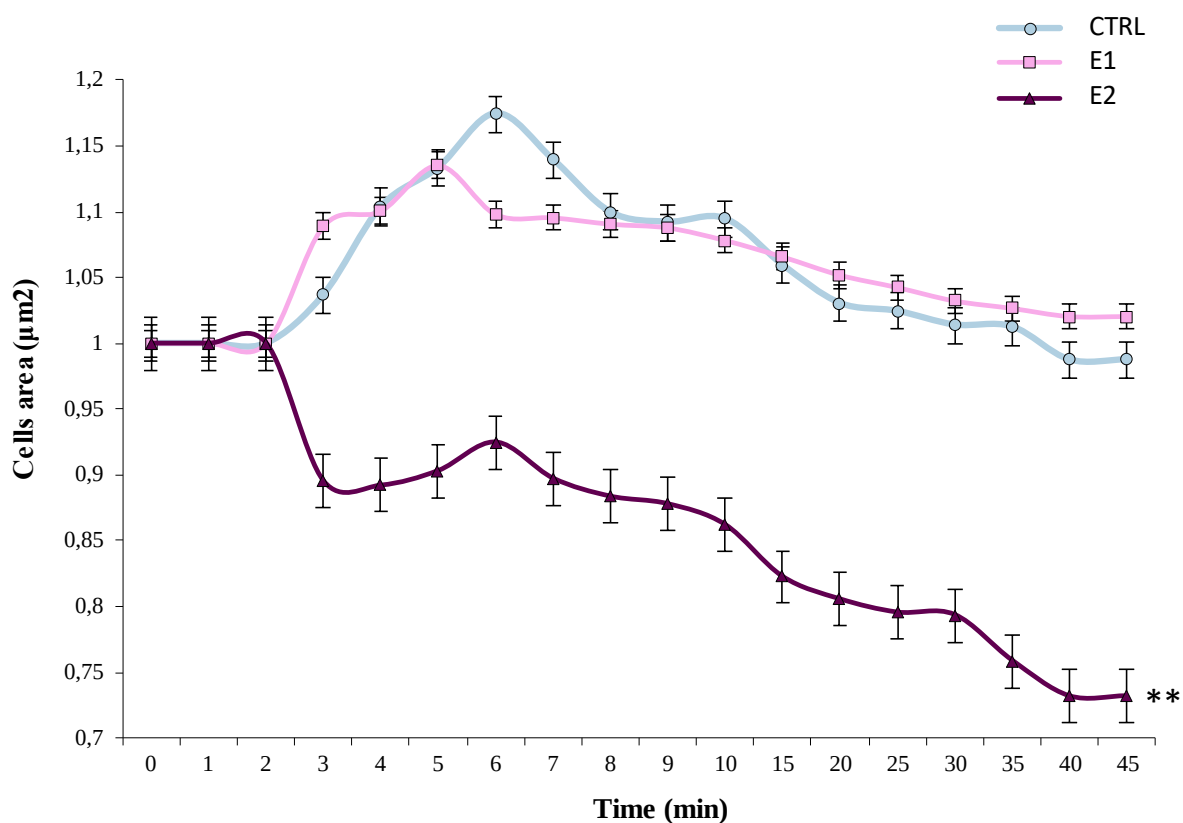


Figura 36: Diminuzione del volume di regolazione (RVD) delle cellule GD di *M. galloprovincialis* esposte per 10 giorni all'Enalapril. Le curve rappresentano le variazioni del volume cellulare nel tempo (min) in risposta alla soluzione ipotonica. I cerchi (●) rappresentano il controllo (0 ng/L); i quadrati (■) rappresentano il gruppo E1 (0,6 ng/L di Enalapril); i triangoli (▲) rappresentano il gruppo E2 (600 ng/L di Enalapril). I dati sono stati espressi come area cellulare media $\pm$ SE di misurazioni in triplo. Le statistiche sono state valutate con il test One way ANOVA (**p < 0,01: E2 vs controllo).

3.2.8.8. Osservazioni morfologiche

L'analisi istologica di sezioni di GD provenienti da mitili di controllo, colorate con eosina, ha mostrato una struttura tipica costituita da tessuti digerenti e connettivi di deposito (Figura 37a-d). In particolare, il tessuto connettivo circondava i dotti e i tubuli digestivi. Nei dotti, le cellule epiteliali cilindriche erano ciliate ai poli apicali e presentavano nuclei allungati. L'epitelio dei tubuli conteneva cellule colonnari (Figura 37; frecce nere) e basofile piramidali (Figura 37; frecce rosse). Nel tessuto connettivo circostante sono state osservate cellule connettivali vescicolari (VCT) e cellule eosinofile adipogranulari (ADG). Un'organizzazione strutturale simile è stata osservata nella GD delle cozze esposte alle due concentrazioni di Enalapril. Tuttavia, rispetto al gruppo di controllo, è stato osservato un aumento delle cellule eosinofile, alcune delle quali rappresentate da emociti binucleati (Figura 37; frecce gialle) nelle sezioni della GD dei gruppi E1 (Figura 37 e, f) ed E2 (Figura 37 i, l). La presenza di emociti è stata rilevata soprattutto nel tessuto connettivo (Figura 37; frecce gialle). Inoltre, nei gruppi trattati, è stata osservata una diffusa eosinofilia a livello delle cellule AGD che circondano i tubuli digestivi, particolarmente evidente nel gruppo E2.

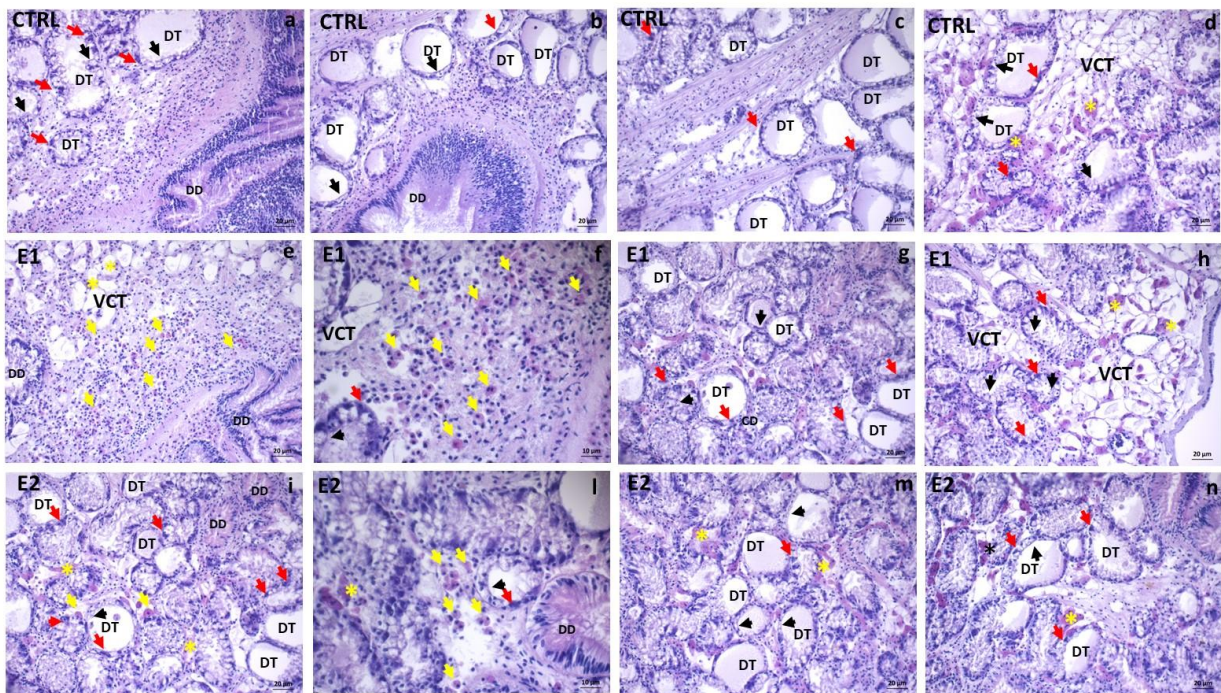


Figura 37: Effetti dell'esposizione all'Enalapril sulla morfologia della GD in *M. galloprovincialis*. Sezioni colorate con ematossilina-eosina di ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis*: CTRL (a-d), E1 (e-h), E2 (i-n). Il parenchima è costituito da dotti digestivi (DD) e tubuli digestivi (DT) con cellule basofile piramidali (frecce rosse) e colonnari (frecce nere). Nello stroma sono presenti cellule del tessuto connettivo vescicolare (VCT) e adipogranulari (ADG; asterischi gialli). Nei gruppi E1 (e, f) ed E2 (i, l), gli emociti sono indicati dalle frecce gialle.

3.2.8.9. Immunolocalizzazione delle proteine correlate allo stress

L'analisi di immunolocalizzazione ha rivelato la presenza delle proteine legate allo stress HSP90 e HSP70 nelle sezioni di GD di entrambi i gruppi trattati con CTRL ed enalapril. Nel gruppo CTRL, il segnale HSP90 si è localizzato nel tessuto connettivo della ghiandola, in particolare a livello della membrana delle cellule VCT e nel citoplasma delle cellule ADG (Figura 38a-d). Nel gruppo trattato con enalapril 0,6 ng/L, il segnale era principalmente confinato alla membrana delle cellule VCT (Figura 38 e-h). Dopo l'esposizione alla concentrazione più alta di enalapril, il segnale HSP90 era maggiormente rilevabile in entrambi i componenti del tessuto connettivo (Figura 38 i-n). HSP70 si è localizzato nel parenchima della GD. In particolare, nel gruppo di controllo, la

proteina si è localizzata a livello delle cellule epiteliali che circondano il lume dei tubuli digestivi (Figura 39 a-d; frecce gialle). Non sono state rilevate proteine nei dotti (DD) e nel tessuto connettivo. Non sono state osservate differenze nella localizzazione di HSP70 tra i gruppi di controllo e quelli trattati con enalapril (Figura 39 e-n). La quantificazione di HSP90 e HSP70 mediante western blotting non ha rivelato cambiamenti significativi nell'espressione proteica nelle tre condizioni sperimentali (Figura 40).

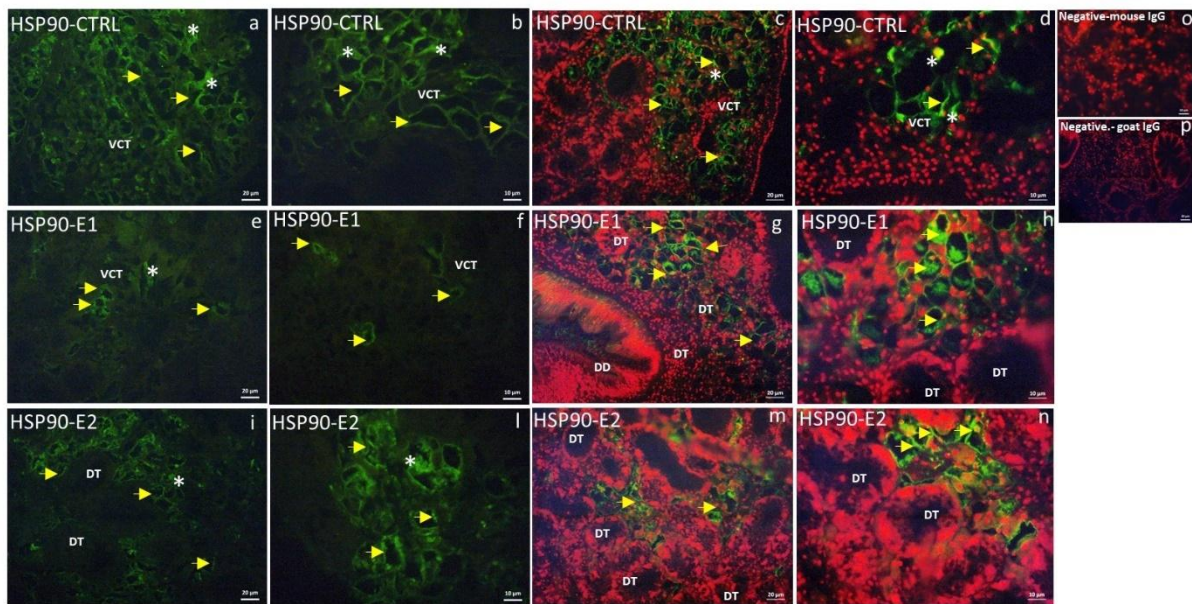


Figura 38: Immunolocalizzazione di HSP90 in sezioni di GD di *M. galloprovincialis* di controllo (a-d) ed esposto a Enalapril (e-n). Il segnale è localizzato nello stroma a livello delle cellule VCT (tessuto connettivo vescicolare) e ADG (adipogranulare) (asterischi bianchi). Negativo: topo (o), capra (p) (anticorpo secondario). (c, d, g, h, m, n), nuclei (rosso) sono controcolorati con ioduro di propidio.

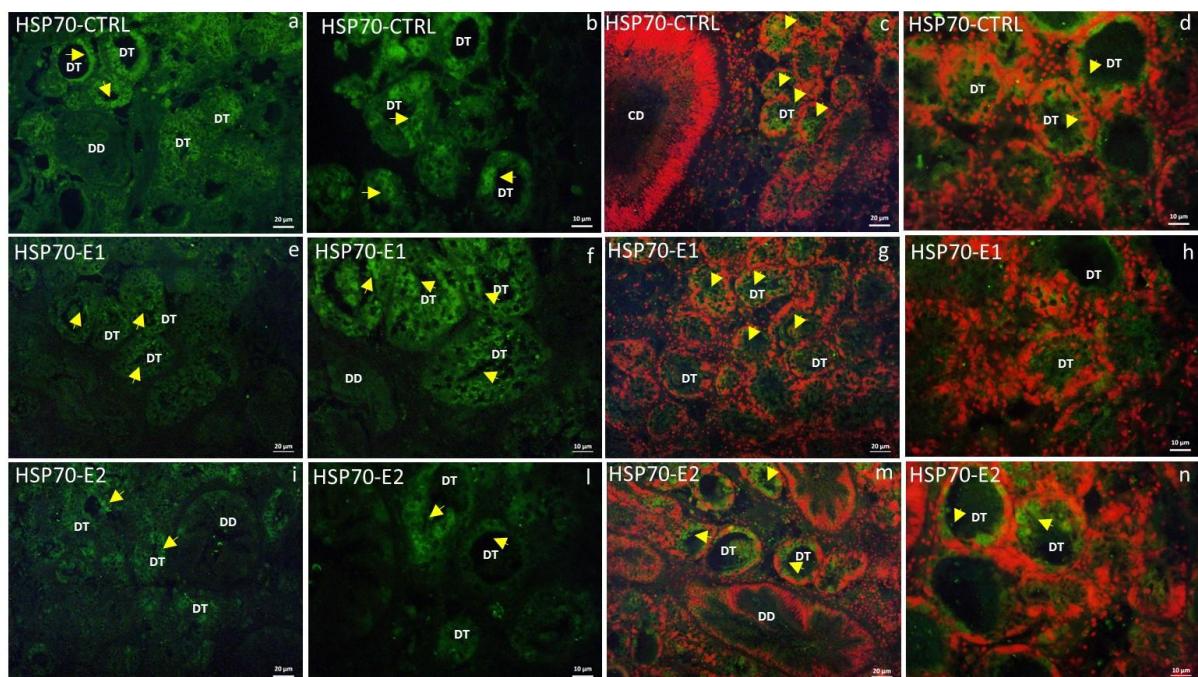


Figura 39: Immunolocalizzazione di HSP70 in sezioni di GD di *M. galloprovincialis* di controllo ed esposto a Enalapril. Nei gruppi di CTRL (a-d) che E1 (e-h) ed E2 (i, l, m, n), la proteina si localizza a livello epiteliale (freccie gialle) dei tubuli digestivi (DT). Il segnale è assente nei dotti (DD) e nel tessuto connettivo. In c, d, g, h, m e n, i nuclei (in rosso) sono controcolorati con ioduro di propidio.

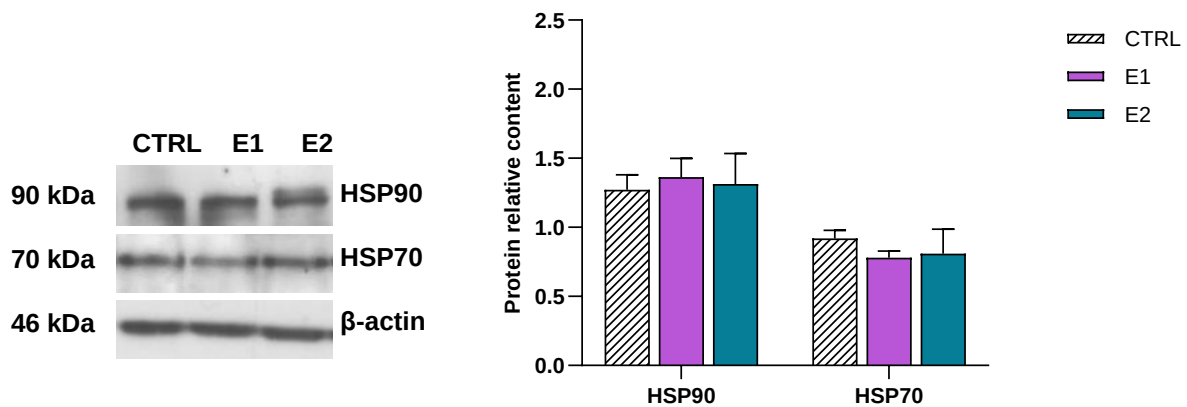


Figura 40: Espressione di proteine correlate allo stress nella GD di *M. galloprovincialis* di controllo ed esposto a Enalapril. Espressione di HSP90 e HSP70 in estratti di GD di mitili esposti a nessun farmaco, oppure a Enalapril 0.6 ng/L (E1) o Enalapril 600 ng/L (E2) (N=5 per ciascuna condizione). Le statistiche sono state valutate mediante ANOVA a una via seguita dal post-hoc Tukey test ($p < 0.05$).

3.2.8.10. Valutazione dello stato ossidativo

La misurazione dell'attività degli enzimi antiossidanti e dei livelli di prodotti ossidativi, utilizzati come indici di alterazione dell'omeostasi ossidativa (Filice et al., 2023; Lombardo et al., 2022), non ha rivelato cambiamenti significativi negli animali esposti all'Enalapril rispetto al gruppo di controllo. Rispetto al gruppo di controllo, la GD dei mitili esposti sia a 0,6 che a 600 ng/L di Enalapril ha mostrato valori simili di attività di SOD e CAT (Figura 41). Parallelamente, la quantificazione del TBARS (indice di LPO) e dei livelli di OMP (indice di ossidazione proteica), in termini di derivati aldeidici e chetonici, non ha mostrato differenze significative tra le tre condizioni sperimentali (Figura 41).

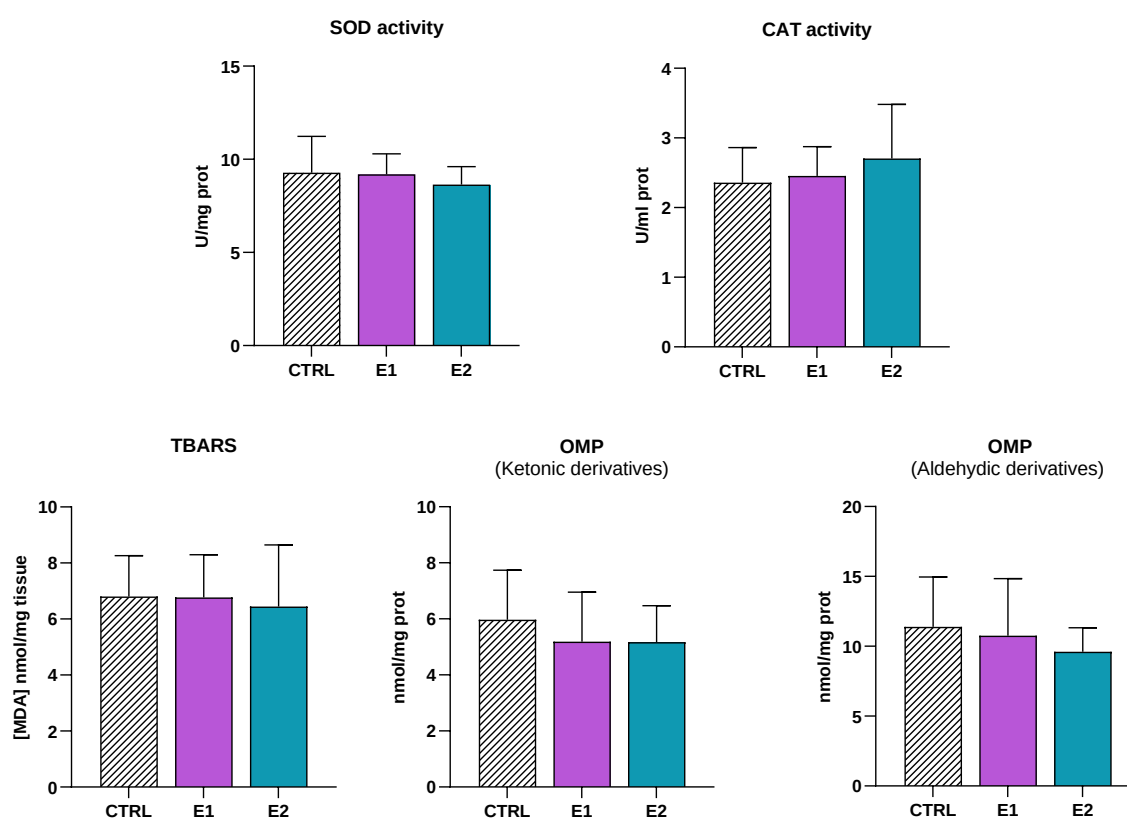


Figura 41: Effetti dell'esposizione all'Enalapril sui biomarcatori dello stress ossidativo nella GD di *M. galloprovincialis*. I dati sono espressi come media $\pm$ SE dei valori assoluti dei singoli esperimenti eseguiti in doppio (N= 6 per ogni condizione). Le statistiche sono state valutate mediante ANOVA a una via seguita dal post hoc Tukey test.

3.2.9. Discussioni

Il presente studio ha evidenziato che l'esposizione all'antipertensivo Enalapril influisce sulla funzionalità della GD di *M. galloprovincialis*, compromettendo la capacità delle sue cellule di far fronte a cambiamenti osmotici e attivando così una risposta infiammatoria caratterizzata da un aumento dell'infiltrazione di emociti. Tuttavia, ciò non sembra influenzare altri marcatori di salute, come lo stato ossidativo, l'espressione e la localizzazione di proteine legate allo stress, la vitalità degli emociti e la produzione di bisso.

La presenza di farmaci nell'ambiente comporta l'esposizione del biota e rappresenta un potenziale rischio per gli ecosistemi (Freitas et al., 2020). Sebbene siano disponibili dati considerevoli sulla presenza di queste sostanze nell'ambiente acquatico, gli studi che valutano il loro potenziale bioaccumulo nelle specie non bersaglio sono ancora limitati e relativamente scarsi. Le informazioni presenti in letteratura derivano principalmente da studi condotti in condizioni controllate di laboratorio che hanno dimostrato la capacità di molluschi, crostacei e pesci di accumulare farmaci, compresi gli antipertensivi (Mezzelani et al., 2018). Nel caso dell'Enalapril, i pochi dati disponibili, ottenuti nel pesce neotropico *Cnesterodon decemmaculatus* esposto a 600 µg/L di farmaco per 96 ore, documentano una bassa capacità di accumulo (Rojo et al., 2023). Allo stesso modo, la nostra analisi non ha rivelato la presenza di Enalapril in *M. galloprovincialis*, il che suggerisce, anche in questo mollusco, l'assenza di bioaccumulo. Questo risultato è in linea con l'ipotesi avanzata da Rojo et al., (2023), secondo cui ciò potrebbe essere dovuto principalmente alla limitata biodisponibilità del farmaco che, in soluzione acquosa e a pH neutro, esiste come anione monovalente altamente idrofilo ($\log D_{ow}$: 0,61). Inoltre, in ambiente acquatico, viene degradato a Enalaprilato, a seconda del pH, della temperatura e dell'esposizione alla luce (Bhardwaj & Singh, 2008). Nelle specie di mammiferi, le esterasi epatiche metabolizzano rapidamente l'Enalapril nel suo metabolita attivo (Enalaprilato). Se questo processo avviene anche in *M. galloprovincialis* e se può contribuire a limitare l'accumulo tissutale, merita ulteriori indagini. Per ancorarsi e sopravvivere nel loro ambiente, le specie di *Mytilus spp.* producono placche di bisso. La

produzione di bisso dipende fortemente dalla qualità dell'acqua in cui vivono. La presenza di contaminanti, inclusi i farmaci, può influire sulla quantità di energia disponibile per l'animale, riducendo la produzione di bisso e alterando la superficie delle placche per migliorare l'adesione (Impellitteri et al., 2024). In *M. edulis*, tre settimane di esposizione a diclofenac e propranololo hanno portato a una diminuzione del numero di placche prodotte, particolarmente evidente alla concentrazione più alta (10.000 µg/L) per entrambi i farmaci (Ericson et al., 2010). Al contrario, in *M. galloprovincialis*, l'esposizione per 14 giorni alla clorpromazina ha provocato una diminuzione del numero di placche alla concentrazione più bassa e un aumento a quella più alta (1000 volte) (Impellitteri et al., 2024). Sebbene non statisticamente significativa, nel nostro studio è stata osservata una tendenza simile in risposta all'esposizione all'enalapril, con una diminuzione del numero di placche alla concentrazione ambientale (E1: 78) e un aumento a una concentrazione 1000 volte superiore (E2: 102). Per valutare lo stato di salute di *M. galloprovincialis* esposto all'enalapril, si è eseguito test di vitalità cellulare sia sull'emolinfa che sulle cellule GD. L'applicazione del metodo di assorbimento del RN per gli emociti dei bivalvi ha permesso di valutare la stabilità della membrana lisosomiale, aspetto cruciale per comprendere la risposta dell'organismo ai fattori di stress. È stata osservata una lieve, ma non significativa, diminuzione della vitalità nei mitili esposti all'Enalapril. Allo stesso modo, il test di esclusione del colorante TB, utilizzato per valutare il numero di cellule vitali, non ha rivelato cambiamenti significativi tra i gruppi sperimentali, con una media superiore al 90%. Ciò è in linea con studi precedenti che hanno dimostrato che diversi contaminanti non sono in grado di alterare la vitalità cellulare (Impellitteri et al., 2023b; Pagano et al., 2022; Porretti et al., 2023; Tresnakova et al., 2023a). Tuttavia, va sottolineato che, sebbene questi due test valutino principalmente l'integrità della membrana cellulare, un aspetto fondamentale della vitalità, essi offrono una prospettiva limitata sulla salute e sulla funzione cellulare complessive (Multisanti et al., 2023). Per approfondire questo aspetto, un importante contributo può essere ottenuto attraverso l'analisi della RVD, che fornisce informazioni su come le cellule rispondono ai cambiamenti osmotici (Faggio et al., 2011; Pagano et al., 2016; Torre et al., 2013a). La valutazione RVD effettuata sulle cellule GD di animali esposti all'enalapril ha rivelato un

modello interessante. Mentre i test di vitalità indicavano un'integrità di membrana intatta, le cellule del gruppo E2 hanno dimostrato una perdita della capacità di regolare efficacemente il proprio volume. Ciò è stato dimostrato dal mancato ritorno al volume originale e da un recupero anomalo dopo l'esposizione a una soluzione ipotonica. Questo comportamento è in linea con gli studi che hanno esaminato la risposta di invertebrati e non invertebrati a diversi contaminanti presenti negli ambienti acquatici, tra cui i metalli pesanti (Banaee et al., 2022; Torre et al., 2013b), pesticidi e fungicidi (Ravi et al., 2023; Tresnakova et al., 2023a,b) e farmaci (Impellitteri et al., 2023a; Pagano et al., 2022). Le osservazioni hanno evidenziato il potenziale impatto dell'Enalapril sul processo di osmoregolazione, cruciale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare nel *M. galloprovincialis*.

A questo proposito, è ben noto che gli ACE inibitori, contrastando l'attività dell'ACE, influenzano direttamente il sistema renina-angiotensina (RAS), uno dei principali regolatori dell'omeostasi dei fluidi corporei e uno dei più antichi sistemi ormonali nella filogenesi dei vertebrati (Nishimura, 2017). Omologhi dei peptidi dell'angiotensina, così come la presenza di altri componenti (enzimi e recettori) di questa via di segnalazione, è stata documentata sia nei vertebrati mammiferi sia in quelli non mammiferi (Filice et al., 2017; Filice et al., 2022; Imbrogno et al., 2013; Nishimura, 2017; Nishimura & Sequeira-Lopez, 2021), compresi i pesci, nei quali il RAS partecipa anche all'osmoregolazione e all'adattamento alla salinità (Brown & Hazon, 2019; Nishimura, 2014). L'importanza evolutiva di questo sistema è ulteriormente dimostrata dalla sua presenza anche nelle specie di invertebrati (Salzet et al., 2001), compresi i molluschi. In particolare, Laurent e colleghi (Laurent et al., 1997) hanno documentato nel mollusco *Mytilus edulis* la presenza di un enzima simile all'ACE che presenta le proprietà del dominio C dell'ACE umano e che è in grado di rilasciare angiotensina II dall'angiotensina I con una cinetica simile a quella osservata nei mammiferi. Sebbene la caratterizzazione del sistema RAS nei mitili esuli dallo scopo di questo studio, non possiamo escludere che l'effetto negativo indotto dall'Enalapril sulla regolazione del volume cellulare di *M. galloprovincialis* possa essere legato alla modulazione di un enzima ACE-simile, e quindi a un alterato bilancio idro-salino.

Insieme ai test funzionali, la valutazione degli end point istologici è un approccio attuale per valutare gli effetti biologici indotti dai contaminanti nei tessuti animali (Cui et al., 2023; Sun et al., 2022; Zhou et al., 2023). Nel presente studio, non sono state osservate alterazioni evidenti dell'intera organizzazione strutturale della GD di *M. galloprovincialis* esposto alle due concentrazioni di Enalapril, rispetto al controllo. Parallelamente, nel tessuto connettivo dei mitili trattati è stata rilevata una maggiore infiltrazione di eosinofili. Questo dato è interessante perché suggerisce l'attivazione di una risposta immunitaria. Gli eosinofili, infatti, nell'emolinfa dei mitili, presentano un'elevata attività fagocitaria e sono molto reattivi in relazione alla difesa immunitaria (Lin et al., 2014). Questo processo è noto come meccanismo di difesa multixenobiotica (MXDM) ed è il primo passo della risposta dell'organismo agli xenobiotici (Pagano et al., 2016). In particolare, l'infiltrazione di emociti è comune negli animali esposti a fattori di stress (Natalotto et al., 2015; Stara et al., 2021) e rappresenta un segno di infiammazione dei tessuti (De Vico & Carella, 2012). L'analisi istologica ha inoltre rivelato la presenza di emociti binucleati. La natura di queste cellule rimane sconosciuta. Per quanto riguarda *M. edulis*, è stato proposto che siano il risultato di una replicazione nucleare senza divisione cellulare (Moore & Lowe, 1977), mentre per *M. galloprovincialis* sono state ipotizzate come il prodotto della fusione di granulociti in risposta a condizioni patologiche (Carballal et al., 1997). La loro presenza nell'emolinfa dei mitili esposti all'Enalapril può essere indicativa di una risposta complessa al farmaco. Una descrizione più approfondita di questa risposta merita ulteriori indagini.

Per caratterizzare ulteriormente gli effetti dell'Enalapril su *M. galloprovincialis*, sono state analizzate le proteine dello stress HSP70 e HSP90. Le HSP sono espresse in modo ubiquitario in tutti gli organismi viventi e sono utilizzate come biomarcatori naturali per monitorare l'impatto dei fattori ambientali su varie specie animali (Chen et al., 2024). Nei mitili, le HSP sono sensibili all'esposizione ai farmaci umani (Fabbri et al., 2008). Mediante immunofluorescenza, abbiamo rilevato la presenza delle due proteine nelle sezioni di GD. Per quanto ne sappiamo, questa è la prima volta che viene fornita una prova della presenza e della funzione delle HSP in *M. galloprovincialis*. Abbiamo riscontrato una diversa localizzazione delle due proteine. La HSP90 era localizzata prevalentemente nel

tessuto connettivo, sulla membrana delle cellule VCT e nel citoplasma delle cellule ADG, mentre la HSP70 era localizzata sulle cellule epiteliali che circondano il lume dei tubuli digestivi. Questo diverso modello di espressione potrebbe riflettere un ruolo specifico delle due proteine nella regolazione della risposta dei tessuti allo stress. Una distribuzione simile di HSP70 è stata riportata nel tessuto della GD della cozza *Pinna nobilis* (Lattos et al., 2021), mentre non sono disponibili informazioni su HSP90. Il trattamento con enalapril non ha influenzato la localizzazione delle HSP, ad eccezione di un segnale più debole rilevato per HSP90 a livello delle cellule ADG nel gruppo E1. Analisi parallela tramite Western blotting ha rivelato che l'esposizione alle due concentrazioni di enalapril non ha modificato i livelli di espressione di entrambe le proteine negli estratti di GD. Nei mitili, l'espressione delle HSP in relazione ai contaminanti farmaceutici ha mostrato risposte tessuto-specifiche, anche in relazione alla chimica dei farmaci, alla concentrazione testata e al tempo di esposizione (Franzellitti e Fabbri, 2005; Franzellitti et al., 2020; Hamer et al., 2004). Ad esempio, in *Dreissena polymorpha*, l'esposizione all'ibuprofene è risultata inefficace nel modificare il livello di HSP70 nelle branchie e nella GD (Contardo-Jara et al., 2011), mentre la carbamazepina (CBZ) ha influenzato i livelli di HSP70 mRNA solo nelle branchie, con un aumento dopo un giorno di trattamento e una riduzione dopo sette giorni (Contardo-Jara et al., 2011). Nella stessa specie, l'esposizione a concentrazioni crescenti di metoprololo, un β -bloccante, ha causato un'up-regolazione significativa dell'mRNA di HSP70 nella GD dopo 4 giorni di esposizione alla concentrazione ambientale (5,34 $\mu\text{g/L}$), che si è ripresa dopo 7 giorni. Nelle branchie, è stata osservata un'induzione di HSP70 a diverse concentrazioni di metoprololo (da 0,534 a 534 $\mu\text{g/L}$), a partire da 1 giorno e per tutto il periodo di esposizione (Contardo-Jara et al., 2010). Poiché non abbiamo analizzato gli effetti dell'enalapril in tempi diversi di esposizione, non possiamo escludere che, come osservato per il metoprololo, l'enalapril possa provocare un'induzione precoce delle HSP, che viene poi ripristinata dall'adattamento allo stress prolungato.

Oltre a causare effetti negativi sul metabolismo degli organismi acquatici, alcuni inquinanti possono promuovere la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste specie altamente reattive sono responsabili dell'ossidazione di molte sostanze

cellulari, provocando uno stato di stress ossidativo. Per questo motivo, la misura di specifici enzimi antiossidanti e di biomarcatori dell'ossidazione proteica e della perossidazione lipidica è ampiamente utilizzata per valutare lo stato ossidativo in diverse specie, compresi gli organismi acquatici (Filice et al., 2023; Lushchak, 2011; Zhao et al., 2023). Nei mitili, è stato dimostrato che lo stress ossidativo è coinvolto nel metabolismo dei farmaci antipertensivi. Tuttavia, questo avviene in modo specifico per ogni tessuto e in modo dipendente dalla dose. In *M. galloprovincialis* è stato dimostrato che il propranololo ha un effetto principale nelle branchie: a basse concentrazioni (11 µg/L) aumenta l'attività della GST, mentre ad alte concentrazioni (403 µg/L) recupera la GST, riduce l'attività dell'AChE e aumenta il danno della LPO. Diversamente, nel DG, una bassa concentrazione di propranololo ha ridotto l'attività della GST senza influenzare la CAT e la LPO, anche ad alta concentrazione (Sole et al., 2010). Analogamente, nel mollusco *Perna perna*, l'esposizione al losartan ha aumentato l'attività di GST e GPx nelle branchie (3.000 ng/L), ma non ha avuto effetti sulle attività di GST e GPX e sulla LPO nella GD (Cortez et al., 2018). In linea con questi dati, nelle nostre condizioni sperimentali, l'esposizione a 0,6 ng/L o 600 ng/L di Enalapril non ha influenzato significativamente le attività degli enzimi SOD e CAT, così come i livelli di ossidazione proteica e lipidica nella GD di *M. galloprovincialis*. Sebbene manchino ancora dati sugli effetti dell'Enalapril sulle branchie, i nostri dati supportano l'ipotesi che nei mitili i farmaci antipertensivi possano indurre una risposta tessuto-specifica al danno ossidativo senza effetti rilevanti sulla GD. La possibilità che, in questo tessuto, i livelli basali di enzimi antiossidanti siano adeguati a far fronte allo stress ossidativo indotto dagli antipertensivi rimane un'ipotesi affascinante.

3.2.10. Conclusioni

Il presente studio ha dimostrato che l'esposizione all'ACE-inibitore Enalapril ha compromesso la capacità delle cellule della GD di affrontare i cambiamenti osmotici in *M. galloprovincialis* e ha attivato una risposta infiammatoria caratterizzata da un aumento dell'infiltrazione di emociti. Tali effetti non hanno influenzato la vitalità degli emociti, lo stato ossidativo dei tessuti e l'espressione e la localizzazione delle proteine legate allo stress. Sebbene siano necessari ulteriori studi per comprendere appieno gli esiti negativi osservati, i nostri risultati indicano chiaramente una compromissione della capacità degli animali di far fronte ai cambiamenti osmotici dipendente dall'Enalapril, evidenziandone il potenziale di alterazione dell'omeostasi animale. Alla luce della crescente diffusione di farmaci antipertensivi negli ambienti acquatici, i nostri risultati possono contribuire a incrementare le conoscenze sull'impatto ecologico di questi farmaci, sottolineandone anche l'urgente necessità di protezione dell'ecosistema.

4. L'uomo è il soggetto che subisce le conseguenze dell'esposizione a contaminanti organici

L'uomo molto spesso risulta essere l'ultimo essere nella catena trofica a subire le conseguenze dell'esposizione diretta o indiretta ai contaminanti presenti nell'ambiente e negli organismi acquatici. L'abbondanza a livello ambientale di contaminanti organici, quali plastificanti, PFAS, farmaci, tensioattivi, conservanti e antimicrobici, prodotti fitosanitari, espongono costantemente uomini e donne a conseguenze più o meno gravi. È indubbiamente necessario un cambiamento radicale nell'approccio allo studio dei contaminanti per la salute umana, in quanto bisognerebbe porre maggiore enfasi sui programmi di monitoraggio, sui dati basati sulla popolazione e sugli studi epidemiologici per ricavare relazioni affidabili tra l'esposizione umana e gli esiti sulla salute. In questo modo, sarà possibile sviluppare modelli predittivi più accurati della risposta umana agli agenti tossici.

Riferendosi allo studio condotto nel capitolo 3.1. in cui si è evidenziato come l'esposizione a sostanze estranee comportino cambiamenti nei parametri nutrizionali, quali il profilo degli acidi grassi, lipidi e proteine totali in organismi che fanno parte della nostra dieta, ci si è chiesti se ciò avesse conseguenze anche sull'uomo. Ad esempio, è noto come presenza di tereftalato nelle acque e nel biota del Mediterraneo sia in costante aumento, il che è preoccupante perché si è evidenziato come esso possa accumularsi negli organismi più in alto nella catena alimentare, fino anche gli esseri umani. Ciò evidenzia l'urgenza di ridurre l'inquinamento da plastica nei nostri ecosistemi acquatici. È inoltre fondamentale comprendere meglio quale sia il suo impatto sulla vita marina e, in ultima analisi, sulla salute umana. Poiché i plastificanti possono alterare il valore nutrizionale dei frutti di mare, che sono una importante fonte di nutrienti per gli esseri umani, questo tipo di inquinamento può avere conseguenze significative per la salute umana.

È stata effettuata per questo motivo una valutazione parallela dei livelli di plastificanti ftalati (PAE), non-ftalati (NPP), e di bisfenoli nella popolazione femminile di una provincia della Sicilia (Di Bella et al., 2023). Gli ftalati sono notoriamente identificati come

interferenti endocrini che, interferendo con i recettori cellulari deputati al legame degli ormoni steroidei, alterano il corretto funzionamento del sistema riproduttivo (Agenzia Chimica Europea, 2018). In effetti, il DBP ha già dimostrato di avere una rilevante attività estrogenica, grazie alla capacità di legarsi ai recettori estrogenici (Chebbi et al., 2022; Beltifa et al., 2018a). Una recente revisione di Green et al., (2021) ha riportato che DEHP e i suoi metaboliti sono stati associati a una diminuzione della conta dei follicoli antrali. Inoltre, sono stati osservati una diminuzione della produzione di ovociti, del tasso di gravidanza e di nati vivi, una diminuzione dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) e un aumento della globulina ormonale legante (SHBG) nel siero. Per far fronte alle crescenti problematiche sanitarie e all'aumento della produzione di prodotti in plastica, sono stati introdotti e ampiamente utilizzati nella produzione di PVC, film alimentari, lubrificanti e cosmetici, i plastificanti non ftalati, quali gli adipati, i sebacati e i tereftalati. Questi plastificanti non ftalati presentano tassi di migrazione ridotti e, ad oggi, non sono sottoposti a restrizioni d'uso (Jebara et al., 2021). I plastificanti non ftalati non presentano effetti tossici standard come la cancerogenicità, la mutagenicità e la tossicità riproduttiva. Tuttavia, il legame tra queste sostanze chimiche e altri effetti non standard, come la tossicità dello sviluppo precoce o l'alterazione del sistema endocrino, non sono ancora del tutto appurati e, considerando gli enormi volumi di produzione di tali sostanze, dovrebbe essere affrontato al più presto (Bui et al., 2016).

Tra i bisfenoli (BP), il BPA è una tipica sostanza chimica che è in grado di alterare il sistema endocrino ed è stata associata a molte malattie umane, come il diabete, l'obesità, le malattie cardiovascolari, respiratorie croniche e renali, il cancro al seno, i disturbi comportamentali e riproduttivi sia nelle donne che negli uomini (Edaes & de Souza, 2022). Inoltre, un recente studio ha evidenziato come il BPA abbia effetti sulla salute sia della madre che del feto, tra cui problemi respiratori nei bambini, l'esposizione prenatale può aumentare il rischio di disfunzioni neuro-sviluppamentali nei feti, cambiamenti nel comportamento, nascite pretermine, restrizione della crescita fetale e alterazioni nella lunghezza e peso alla nascita, particolarmente nei maschi e diabete gestazionale (Costa et al., 2025; Al-Saleh et al., 2025). Inoltre, recentemente l'Europa, con il Regolamento (UE) 2024/3190 della Commissione, ha vietato l'uso del BPA e dei suoi Sali nella

fabbricazione di materiali e articoli a contatto con alimenti (Commission Regulation, 2024). Di conseguenza, uno dei problemi principali è la sostituzione di questa sostanza con alternative più sicure, come ad esempio gli analoghi del BPA. Attualmente, i sostituti del BPA più utilizzati sono il bisfenolo S (BPS) e il bisfenolo F (BPF), soprattutto nella produzione di resine epossidiche e plastiche in polycarbonato. Tuttavia, si possono ipotizzare effetti simili al BPA anche per questi BP alternativi, a causa della loro struttura chimica molto simile (Eladak et al., 2015; Maćczak et al., 2017; den Braver-Sewradj et al., 2020). L'ampia letteratura in merito ha evidenziato la presenza sempre più diffusa di queste sostanze sia nell'ambiente (marino e terrestre), che in diverse matrici biologiche, tra questi, l'urina (He et al., 2009; Koch et al., 2007; Jala et al., 2022), il latte materno (Iribarne-Durán et al., 2022; Main et al., 2006), i capelli (He et al., 2018) e il sangue del cordone ombelicale (Sunman et al., 2019) e, non ultimo, il sangue (Colón et al., 2000; Lee et al., 2008), in quanto considerati validi biomarcatori di esposizione per il monitoraggio ambientale della salute di gruppi di popolazione vulnerabili (Högberg et al., 2008; Katsikantami et al., 2016).

In questo contesto, lo scopo dello studio condotto da Di Bella et al., (2023) è stato quello di valutare la presenza di ftalati, non ftalati e bisfenoli nel sangue di donne di età compresa tra i 20 e i 60 anni, residenti in Sicilia (Italia). Inoltre, è stata eseguita un'interpretazione statistica, basata su strumenti univariati e multivariati, per verificare l'esistenza di una potenziale relazione tra il contenuto ematico di tali composti e l'età. Si spera che questo studio possa gettare luce sulla questione della presenza dei plastificanti nel sangue femminile e gettare così le basi per una migliore comprensione dell'insorgenza precoce o tardiva di quelle patologie legate alla presenza di questi composti nelle matrici biologiche in determinate fasce d'età (Figura 42).



Screening of phthalate and non-phthalate plasticizers and bisphenols in Sicilian women's blood

Giuseppa Di Bella^{a,*}, Miriam Porretti^b, Mirea Cafarelli^b, Federica Litrenta^a,
Angela Giorgia Potorti^a, Vincenzo Lo Turco^a, Ambrogina Albergamo^a, Monica Xhilari^c,
Caterina Faggio^{b,*}

^a Department of Biomedical, Dental and Morphological and Functional Imaging Sciences of the University of Messina, Messina, Italy

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

^c Laboratory analysis Aesculapius, Patti, ME, Italy

Figura 42: Di Bella et al., 2023.

Nel periodo maggio-ottobre 2021, sono state selezionate per il presente studio $n = 75$ donne sane residenti nella provincia di Messina (Sicilia, Italia) di età compresa tra 20 e 60 anni. A ogni partecipante è stato chiesto di firmare il consenso informato e sono stati raccolti 5 ml di sangue venoso intero.

Successivamente, i campioni di sangue sono stati suddivisi in tre coorti in base all'età delle donne:

- il primo gruppo aveva un'età compresa tra i 20 e i 44 anni (donne in età riproduttiva, $n = 25$),
- il secondo gruppo aveva un'età compresa tra 45 e 50 anni (donne in premenopausa, $n = 25$);
- il terzo gruppo aveva un'età compresa tra 51 e 60 anni (donne in menopausa, $n = 25$).

Le microplastiche (MP) contengono diverse sostanze chimiche aggiunte durante il processo di produzione, tra cui i plastificanti con nota attività di interferenza endocrina, come PAE, NPP e BP. Tali sostanze chimiche intrinseche sono state segnalate per avere un movimento costante lungo il gradiente di concentrazione, in quanto la plastica continua a essere frammentata in MP e possono essere traslocate quando le MP entrano

in contatto con superfici, organi o tessuti del corpo (Browne et al., 2011), interferendo così con gli ormoni endogeni, anche a basse concentrazioni (Cole et al., 2011). Negli ultimi due decenni, è stato effettuato il monitoraggio dei plastificanti nel sangue umano (Owczarek et al., 2018; Wan et al., 2013; Genuis et al., 2012; Latini et al., 2003; Lee et al., 2008; Colón et al., 2000; Yang et al., 2009; Cobellis et al., 2009), anche in riferimento a gruppi vulnerabili della popolazione italiana (Latini et al., 2003; Cobellis et al., 2009). In accordo con la letteratura precedente e con la natura ubiquitaria di questi composti, il presente studio ha confermato l'esposizione diffusa a diversi residui di PAE e BP anche nel sangue di donne siciliane di diverse età, mentre i NPP, come DEHT (Bis(2-ethylhexyl) tereftalato) e DEHA (Bis(2-ethylhexyl) adipato), sono stati rilevati in questo studio per la prima volta. Indipendentemente dal gruppo di età, i residui più abbondanti rilevati nel sangue femminile sono risultati essere DiBP (diisobutilftalato), DEHP (Bis(2-ethylhexyl) ftalato), DEHT e BPA. Tra questi, il DEHP è ancora il plastificante più comunemente impiegato nei prodotti in plastica, nonostante l'Unione Europea ne abbia limitato l'uso in molti prodotti commerciali (come, ad esempio, giocattoli e prodotti per l'infanzia) negli ultimi vent'anni (European Commission, 2006). Al contrario, DEHT sta emergendo come uno dei principali plastificanti sostitutivi nei materiali in PVC (ChemSec, 2019) e il BPA è il principale plastificante impiegato nella produzione dei più comuni prodotti in polivinil cloruro. Inoltre, la loro abbondanza nelle matrici biologiche può essere spiegata dal peso molecolare relativamente elevato, dalla minore solubilità in acqua e, di conseguenza, dalla maggiore capacità di accumulo di tali composti nei tessuti corporei (Cheng et al., 2013; Torres-García et al., 2022). In base ai dati ottenuti in questo studio, sono stati evidenziati intervalli di concentrazione di PAE più elevati rispetto alla letteratura precedente (Colón et al., 2000; Högberg et al., 2008; Wan et al., 2013), in correlazione con il drastico aumento dei volumi di produzione di plastica osservato negli ultimi decenni. Per facilitare questo confronto, la Tabella 26 riassume i dati di questo studio e li confronta con quelli riportati in letteratura.

Tabella 26: Confronto tra il livello di plastificanti trovato nel sangue di questo studio e quello dalla letteratura precedente.

Composto	Range di concentrazione		Reference
	Questo studio	Studi precedenti	
DMP	0,35–0,40 mg/ L	-	
DEP	0,27–0,30 mg/ L	0,002–0,009 mg/L	Colón et al., (2000)
		0,0003 mg/L	Högberg et al., (2008)
DiBP	0,59–0,75 mg/ L	0,006–0,005 mg/L	Wan et al., (2013)
DEHP	0,62–0,65 mg/ L	0,016–0,513 mg/L	Colón et al., (2000)
		1,15–2,05 mg/L	Latini et al., (2003)
DBP	0,40–0,42 mg/ L	0,019–0,067 mg/L	Colón et al., (2000)
		0,006 mg/L	Högberg et al., (2008)
		0,005–0,004 mg/L	Wan et al., (2013)
DEHT	0,38–0,89 mg/ L	-	
DEHA	0,39–0,41 mg/ L	-	
BPA	1,56–2,19 µg/L	<LOD-2,84 µg/L	He et al., (2009)
		<LOD-66,46 µg/L,	Lee et al., (2008)
		<LOD-8,86 µg/L	Cobellis et al., (2009)
		0,12 µg/L	Owezarek et al., (2018)
		2,91 µg/L	Yang et al., (2009)
		0,12 µg/L	
		1,69 µg/L	
BPS	0,58–1,04 µg/L;	5,15 µg/L	Cobellis et L., (2009)
		1,14 µg/L	Owezarek et al., (2018)

Oltre a garantire la determinazione di PAE, NPP e BP, questo studio ha proposto per la prima volta un valido approccio statistico in grado di mostrare come alcuni composti variassero significativamente in base all'età delle donne. Infatti, le donne in premenopausa e in età riproduttiva presentavano un maggior contenuto di PAE, come DEHP e DiBP, e di BPA e BPS rispetto alle donne più anziane che erano già in menopausa.

Sulla base dell'evidenza che il sangue umano contiene informazioni fondamentali sull'esposizione a breve termine agli xenobiotici (Owczarek et al., 2018) e che i plastificanti presentano un'emivita relativamente breve in quanto vengono rapidamente metabolizzati nell'organismo umano (Koch et al., 2004; Wittassek & Angerer, 2008; Vandenberg et al., 2010), il maggior contenuto di DEHP e DiBP nelle donne in età riproduttiva e in premenopausa si correla bene con i gruppi di età più giovani, che tendono a utilizzare una serie di prodotti in PVC e PC contenenti questi comuni plastificanti in quantità maggiori, come giocattoli, cosmetici, prodotti per l'infanzia e per l'igiene personale, involucri per bottiglie, contenitori per alimenti, ecc. Inoltre, sebbene il contenuto di plastificanti, come ad esempio DEP e DBP non hanno mostrato alcun potere discriminatorio in relazione all'età delle partecipanti, ma hanno comunque presentato diverse frequenze di rilevamento tra i gruppi di età analizzati, il che potrebbe indicare un uso più frequente di prodotti contenenti plastiche da parte dei più giovani.

Eales e collaboratori (2022), hanno inoltre fornito una panoramica degli impatti sulla salute umana derivati dall'esposizione ai plastificanti ftalati. I risultati includono: Evidenze robuste per un'associazione con una qualità inferiore dello sperma, neurosviluppo e rischio di asma infantile; Evidenze moderate per impatti sulla distanza anogenitale nei ragazzi, basso peso alla nascita, endometriosi, diminuzione del testosterone, ADHD, diabete di tipo 2 e cancro al seno/utero; Alcune evidenze per altri esiti come anomalie nella distanza anofourchette, ormoni sessuali fetali, nascita pretermine, conteggio follicolare antrale ridotto, riduzione dell'estradiolo, autismo, obesità, funzione tiroidea e disturbi dell'udito. L'esposizione al BPA ha causato effetti negativi sulla salute, tra cui effetti riproduttivi e sullo sviluppo, malattie metaboliche e altri effetti sulla salute. Questi studi comprendono esposizioni sia prenatali che postnatali (Rochester, 2013).

L'alimentazione di molluschi in particolare dalle popolazioni che vivono nelle zone costiere, che fanno affidamento su questi animali per una parte sostanziale della loro dieta. Ad esempio, la salsa ottenuta da un decotto di *Mytilus edulis*, è tradizionalmente utilizzata in Cina per le sue proprietà immunostimolanti e per il trattamento di disfunzioni epatiche e renali, nonché di impotenza e menoxenia (cambiamenti nel ciclo mestruale)

(Li & Ding, 2006). Al giorno d'oggi, i molluschi, compresi i bivalvi, sono oggetto di raccolta commerciale e rivestono un'importanza notevole per le industrie dell'acquacoltura di tutto il mondo. I mitili marini della famiglia *Mytilidae*, che comprende generi come *Mytilus* e *Perna*, sono molto diffusi nell'alimentazione umana, in quanto forniscono alti livelli di proteine, acidi grassi polinsaturi omega-3 (PUFA), iodio e carboidrati.

Si stima tuttavia che consumando una porzione media di cozze (250 g di peso umido), si possono introdurre nell'organismo fino a circa 90 particelle di microplastiche. Una porzione media di circa 6 ostriche (100 g di peso umido) possono arrivare a contenere fino a 50 particelle. Il consumo di molluschi varia notevolmente da Paese a Paese; in Europa, ad esempio, il consumo di molluschi può differire di oltre 70 volte tra consumatori e non consumatori (EFSA, 2011). I maggiori consumatori europei si trovano in Belgio (maggiormente la popolazione anziana), con un consumo pro capite di 72,1 g al giorno, mentre paesi quali Francia (adolescenti) e Irlanda (adulti) hanno il consumo pro capite più basso: solo 11.8 g al giorno per entrambi i Paesi (EFSA, 2011), mentre l'Italia si piazza a metà, consumando in media 38.8 g al giorno (Leclercq et al., 2009). Considerata la stretta relazione anche tra cibo e salute, i componenti bioattivi dei mitili hanno dimostrato di svolgere un ruolo fondamentale nello sviluppo di alimenti funzionali, cioè alimenti con effetti benefici specifici per la salute che vanno oltre la semplice nutrizione, definiti anche come nutraceutici, un'unione tra nutrizione e farmaceutica (Bernal et al., 2011; Haller, 2010; Lordan et al., 2011). Inoltre, l'importanza dei mitili marini come fonte di sostanze bioattive (peptidi, lipidi e carboidrati), e ad esempio di sostanze ad azione antimicrobica, antinfiammatoria e antitumorale, è in rapido aumento (Grienke et al., 2014).

Come mostrato nei capitoli precedenti, l'uomo è esposto ad una moltitudine differente di composti chimici, che possono mediare effetti dannosi. Le cui principali vie di esposizione a questi composti sono la cutanea e l'orale. Nell'analizzare gli effetti potenzialmente tossici di vari composti organici presenti nei prodotti per la cura della persona (che hanno come via di assorbimento la cute) sui mitili (alimento) e la presenza dei PFAS nel lucioperca (alimento), si evidenzia come l'assorbimento dei tossici possa avvenire nell'arco della giornata da più vie. Questi risultati sottolineano l'urgenza di sviluppare e implementare strategie efficaci per monitorare e ridurre l'esposizione umana

a questi contaminanti. È essenziale che le politiche di regolamentazione tengano conto dei rischi a lungo termine per proteggere la salute pubblica.

Nel capitolo 3.4. abbiamo trattato gli effetti negativi del tensioattivo SLS sui mitili, ma non solo. Lo studio ha evidenziato come la co-presenza di un prodotto naturale, in questo caso un estratto di buccia di bergamotto, permetta di ristabilire ai valori di controllo i parametri nutrizionali. Ciò evidenzia come la presenza di prodotti naturali, che sono fonte non solo di eventuali effetti benefici- basti pensare alle proprietà antiossidante, antibatterico e antiinfiammatorio, purificante e illuminante dell'estratto di bergamotto- possa inoltre in qualche modo contrastare o attutire gli effetti negativi (quali ad esempio irritanti e/o allergiche) di composti presenti nei prodotti per la cura personale o nei cosmetici, come il sodio lauril solfato. In aggiunta, l'uso di estratti naturali come il bergamotto può contribuire a ridurre la necessità di additivi chimici, promuovendo così formulazioni più sostenibili e rispettose dell'ambiente. Le proprietà multifunzionali degli estratti naturali permettono non solo di mitigare gli effetti avversi di alcuni composti chimici, ma anche di potenziare l'efficacia complessiva dei prodotti per la cura della persona, migliorando la compatibilità con la pelle e riducendo il rischio di reazioni allergiche. Infine, l'integrazione di prodotti naturali nei cosmetici e nei prodotti per la cura personale risponde a una crescente domanda da parte dei consumatori per soluzioni più naturali e sicure. Questo approccio potrebbe aprire nuove strade per l'innovazione nel settore, stimolando la ricerca di nuove sostanze bioattive con potenziali benefici sia per la salute umana che per l'ambiente. In un contesto globale dove la sicurezza e la sostenibilità sono sempre più al centro delle preoccupazioni, la ricerca e lo sviluppo di prodotti naturali rappresentano una direzione promettente per il futuro.

5. Conclusioni

Questa tesi vuole evidenziare l'importanza di considerare approcci più naturali e combinati nella formulazione dei prodotti per la cura personale. Attraverso l'uso sinergico di sostanze naturali si offre una alternativa nella mitigazione degli potenziali effetti negativi dei contaminanti, aprendo anche nuove strade per la ricerca e lo sviluppo di prodotti per la cura personale che siano efficaci e sicuri per l'ambiente e la salute umana. Inoltre, suggerisce una possibile direzione futura per la ricerca e lo sviluppo di prodotti che siano sia efficaci che meno dannosi per l'ambiente e la salute umana. Questo è dato dalla sempre più crescente quantità ritrovata sia nel nostro ambiente che nell'uomo di sostanze ad azione potenziale tossica, che possono portare ad alterazioni della normale fisiologia dell'organismo. Inoltre, avendo trattato specie edibili, si è evidenziato come l'esposizione a tossici si ripercuote sul profilo nutrizionale e quindi sulla qualità del cibo che introduciamo nel nostro organismo tramite la dieta.

Gli effetti a lungo termine delle miscele o dei singoli contaminanti organici presenti nei prodotti per la cura della persona, anche a concentrazioni di ng/L o µg/L, sono ancora in gran parte sconosciuti e potrebbero causare effetti pericolosi sugli organismi acquatici. Gli effetti potenziali di questi composti includono danni citopatologici, alterazioni della funzione endocrina, genotossicità, mutagenesi e cambiamenti nel comportamento degli organismi acquatici. Sebbene esistano differenze metaboliche e fisiologiche tra pesci e mammiferi, sembra che le analogie nella risposta ai composti chimici siano conservate. Questo ci permette di comprendere meglio gli effetti avversi indotti dall'esposizione acuta o cronica ai composti presi in esame, molto spesso dose e tempo-dipendenti. L'esposizione singola o combinata a diversi composti può provocare disfunzioni e malattie relative al sistema cardiovascolare, a quello riproduttivo, a quello ormonale, ai biomarcatori e al comportamento. Dalle ricerche condotte negli ultimi anni è emerso che molti dei composti presi in esame, presenti nell'ambiente, possono addirittura essere letali per alcune specie acquatiche. Questo lavoro mira a evidenziare come i livelli attuali di contaminanti organici siano significativi e in costante aumento e destinati a influire sugli ecosistemi marini.

Questi risultati sono inoltre importanti per gli allevamenti di molluschi gestiti in acque naturali, soprattutto se si considera che i bivalvi sono un anello essenziale della catena alimentare e una componente della dieta mediterranea.

Lo studio sugli effetti del DEHT sulla specie sentinella *Mytilus galloprovincialis* ha evidenziato gli effetti negativi dell'esposizione a tale sostanza, compresi i cambiamenti nei parametri fisiologici e biochimici, nonché le alterazioni dei parametri nutrizionali, come i profili degli acidi grassi, i lipidi totali e le proteine totali. La presenza di tereftalato, in generale, è in costante aumento nelle acque e nel biota del Mediterraneo, il che è preoccupante in quanto può accumularsi negli organismi più in alto nella catena alimentare, come gli esseri umani. Ciò sottolinea l'importanza di ridurre l'inquinamento da plastica nei nostri ecosistemi acquatici e di comprendere meglio il suo impatto sulla vita marina e, in ultima analisi, sulla salute umana. L'urgente necessità di ridurre l'inquinamento da plastica nei nostri ecosistemi acquatici e di comprendere meglio il suo impatto sulla vita marina e, in ultima analisi, sulla salute umana. Poiché i plastificanti possono alterare il valore nutrizionale dei frutti di mare, che sono un'importante fonte di nutrienti per gli esseri umani, questo tipo di inquinamento può avere conseguenze significative per la salute umana. Dai dati ottenuti, emerge una correlazione tra l'età delle donne e il profilo di plastificanti e bisfenoli riscontrato nel loro sangue. Di conseguenza, le fonti di esposizione a tali xenobiotici dovrebbero essere indagate in modo approfondito. È indubbiamente necessario un cambiamento radicale nell'approccio allo studio dei contaminanti per la salute umana, in quanto si dovrebbe porre maggiore enfasi sui programmi di monitoraggio, sui dati basati sulla popolazione e sugli studi epidemiologici per ricavare relazioni affidabili tra l'esposizione umana e gli esiti sulla salute. In questo modo, sarà possibile sviluppare modelli predittivi più accurati della risposta umana ai potenziali agenti tossici. Rappresentando in questo modo un passo avanti nella comprensione degli effetti dei contaminanti organici sui sistemi acquatici e sulla salute umana, dimostrando inoltre la necessità di approcci integrati e sostenibili nella gestione dell'ambiente.

L'analisi condotta sulla presenza dei PFAS sul lucioperca ha evidenziato, inoltre, come vi sia un potenziale rischio associato al consumo di pesce contaminato sia diretto ai

pescatori e delle loro famiglie, che ne sono i primi a consumarlo, sia nel caso esso venga rivenduto localmente.

Effettuare analisi degli effetti di contaminanti organici anche *in vitro* permette di ridurre il numero di esemplari sacrificati, un aspetto fondamentale nella progressione scientifica, oltre a ridurre i costi di stabulazione. Inoltre, queste analisi possono fornire informazioni, in tempi relativamente brevi, utili sulla risposta cellulare e fisiologica direttamente correlata all'esposizione a xenobiotici, essenziali per i futuri saggi *in vivo* e per comprendere meglio i passaggi successivi nella ricerca. La tossicologia *in vitro* ha visto un notevole trend di crescita negli ultimi anni e l'esame delle colture cellulari ha parzialmente sostituito il sacrificio di routine degli animali da esperimento. Gli studi *in vitro*, in qualità di studi preliminari, permettono anche di eliminare le incertezze legate all'uso di animali vivi, poiché spesso non è chiaro se la mortalità o i cambiamenti osservati durante le fasi sperimentali siano dovuti agli effetti tossici degli xenobiotici o a cause naturali. L'approccio dei test *in vitro* potrebbe rivelarsi utile anche per i programmi di monitoraggio ambientale basati sull'uso di organismi sentinella, offrendo così misurazioni della qualità ambientale.

Potenziali approcci innovativi nella gestione dell'inquinamento da contaminanti organici può essere l'uso sinergico di sostanze naturali, che contrastino gli effetti negativi sugli organismi acquatici e permettano di ristabilire e/o migliorare i parametri fisiologici ma soprattutto nutrizionali di organismi che sono nella maggior parte dei casi, destinati al consumo umano.

Affrontare l'inquinamento da contaminanti organici richiede uno sforzo collaborativo a livello internazionale. Infatti, attraverso la cooperazione globale possiamo sviluppare e implementare strategie efficaci per proteggere la salute umana e quella degli ecosistemi. Le industrie devono assumere un ruolo sempre più attivo nell'adozione di pratiche più sostenibili, riducendo l'uso di sostanze chimiche potenzialmente dannose e investendo in alternative naturali e meno nocive. I risultati ottenuti dimostrano altresì chiaramente la necessità di regolamentazioni più rigorose per limitare l'uso e lo smaltimento dei contaminanti organici, al fine di proteggere gli ecosistemi e la salute pubblica.

L'integrazione di tecnologie innovative di monitoraggio e nel trattamento dei contaminanti organici è cruciale per migliorare l'efficacia dei programmi di gestione ambientale e nella riduzione dell'impatto negativo sulla salute umana.

6. Bibliografia e Sitografia

Aalto-Korte, K., Ackermann, L., Henriks-Eckerman, M. L., Välimaa, J., Reinikka-Railo, H., Leppänen, E., & Jolanki, R. (2007). 1, 2-Benzisothiazolin-3-one in disposable polyvinyl chloride gloves for medical use. *Contact Dermatitis*, 57(6), 365-370. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01278.x>

Abo-Al-Ela, H. G., Falco, F., & Faggio, C. (2023). Exposure and health impact of pharmaceutical residue ingestion via dietary sources and drinking water. In *Pharmaceuticals in Aquatic Environments* (pp. 119-139). CRC Press.

Abunada, Z., Alazaiza, M. Y., & Bashir, M. J. (2020). An overview of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the environment: Source, fate, risk and regulations. *Water*, 12(12), 3590. <https://doi.org/10.3390/w12123590>

Adekunle, A. S., Oyekunle, J. A. O., Ojo, O. S., Maxakato, N. W., Olutona, G. O., & Obisesan, O. R. (2017). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon levels of groundwater in Ife north local government area of Osun state, Nigeria. *Toxicology Reports*, 4, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.10.002>

Adekunle, A. S., Oyekunle, J. A. O., Ola, I. J., Obisesan, O. R., & Maxakato, N. W. (2018). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides (OCPs) in some personal care products in Nigeria. *Toxicology reports*, 5, 994-1001. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.10.003>

Aerts, O., Meert, H., Goossens, A., Janssens, S., Lambert, J., Apers, S., 2015. Methylisothiazolinone in selected consumer products in Belgium: adding fuel to the fire? *Contact Dermatitis* 73, 142–149. <https://doi.org/10.1111/cod.12449>

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Perfluoroalkyls: Draft for Public Comment; U.S. Department of Health and Human Services: 2018. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp200.pdf>.

Agency for Toxic Substances, Disease Registry (ATSDR) Minimal Risk Levels (MRLs) for Hazardous Substances (2019). <https://www.atsdr.cdc.gov/mrls/pdfs/ATSDR%20MRLs%20-%20June%202019-H.pdf>

Aguirre-Martínez, G. V., Buratti, S., Fabbri, E., DelValls, A. T., & Martín-Díaz, M. L. (2013). Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. *Journal of Environmental Sciences*, 25(7), 1408-1418. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(12\)60207-1](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(12)60207-1).

Ahmad, S., & Beg, Z. H. (2013). Hypolipidemic and antioxidant activities of thymoquinone and limonene in atherogenic suspension fed rats. *Food chemistry*, 138(2-3), 1116-1124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.109>

- Ahmadniaye Motlagh, H., Horie, Y., Rashid, H., Banaee, M., Multisanti, C. R., & Faggio, C. (2023). Unveiling the effects of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed essential oil as a diet supplement on the biochemical parameters and reproductive function in female common carps (*Cyprinus carpio*). *Water*, 15(16), 2978. <https://doi.org/10.3390/w15162978>
- Åkerblom, S., Negm, N., Wu, P., Bishop, K., & Ahrens, L. (2017). Variation and accumulation patterns of poly-and perfluoroalkyl substances (PFAS) in European perch (*Perca fluviatilis*) across a gradient of pristine Swedish lakes. *Science of the Total Environment*, 599, 1685-1692. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.032>
- Al-Saleh, I., Elkhatib, R., Alnemer, M., Aldhalaan, H., & Shoukri, M. (2025). Impact of maternal Bisphenol A exposure on thyroid hormones and birth anthropometric outcomes: A repeated measures study. *Emerging Contaminants*, 100479. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2025.100479>
- Albergamo, A., Rigano, F., Purcaro, G., Mauceri, A., Fasulo, S., Mondello, L. (2016). Free fatty acid profiling of marine sentinels by nanoLC-ESI-MS for the assessment of environmental pollution effects. *Sci. Total Environ.* 571, 955–962. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.082>
- 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. *J. R. Soc. Interface* 3 (6), 37–43. <https://doi.org/10.1098/rsif.2005.0074>
- Aliko, V., Beqiraj, E.G., Qirjo, M., Cani, M., Rama, A., Bego, K., Reka, A., Faggio, C., 2022. Plastic invasion tolling: first evaluation of microplastics in water and two crab species from the nature reserve lagoony complex of Kune-Vain, Albania. *Sci. Total Environ.* 849, 157799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157799>
- Aliko, V., Mehmeti, E., Qirjo, M., & Faggio, C. (2019). 'Drink and sleep like a fish': goldfish as a behavior model to study pharmaceutical effects in freshwater ecosystems. *Journal of biological research-bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*, 92(1). <https://doi.org/10.4081/jbr.2019.7939>
- Al-Mamun, A. (2017). Pesticide degradations, residues and environmental concerns. *Pesticide Residue in Foods: Sources, Management, and Control*, 87-102. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52683-6_5
- Almeida, Â., Soares, A. M., Esteves, V. I., & Freitas, R. (2021). Occurrence of the antiepileptic carbamazepine in water and bivalves from marine environments: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 86, 103661. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103661>
- Altintzoglou, T., Vanhonacker, F., Verbeke, W., & Luten, J. (2011). Association of health involvement and attitudes towards eating fish on farmed and wild fish consumption in Belgium, Norway and Spain. *Aquaculture International*, 19, 475-488. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9363-2>

- Amoatey, P., & Baawain, M. S. (2019). Effects of pollution on freshwater aquatic organisms. *Water Environment Research*, 91(10), 1272-1287. <https://doi.org/10.1002/wer.1221>.
- Anagnostopoulou, K., Nannou, C., Evgenidou, E., & Lambropoulou, D. (2022). Overarching issues on relevant pesticide transformation products in the aquatic environment: A review. *Science of The Total Environment*, 815, 152863. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152863>
- Anderson, A. G., Grose, J., Pahl, S., Thompson, R. C., & Wyles, K. J. (2016). Microplastics in personal care products: Exploring perceptions of environmentalists, beauticians and students. *Marine pollution bulletin*, 113(1-2), 454-460. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.048>
- Andrade, M., Soares, A. M., Solé, M., Pereira, E., & Freitas, R. (2023). Threats of Pollutants Derived from Electronic Waste to Marine Bivalves: The Case of the Rare-Earth Element Yttrium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(1), 166-177. <https://doi.org/10.1002/etc.5508>.
- Andreu-Sánchez, O., Paraíba, L. C., Jonsson, C. M., & Carrasco, J. M. (2012). Acute toxicity and bioconcentration of fungicide tebuconazole in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology*, 27(2), 109-116. <https://doi.org/10.1002/TOX.20618>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114923>
- Antić, N., Radišić, M., Radović, T., Vasiljević, T., Grujić, S., Petković, A., ... & Laušević, M. (2015). Pesticide residues in the Danube river basin in Serbia—a survey during 2009–2011. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 43(2), 197-204. <https://doi.org/10.1002/clen.201200360>
- Arbeitsgemeinschaft, P.V.C., Umwelt, E.V., 2006. Plasticizers Market Data.
- Argillier, C., Barral, M., & Irz, P. (2012). Growth and diet of the pikeperch Sander lucioperca (L.) in two French reservoirs. *Fisheries & Aquatic Life*, 20(3), 191-200. <https://doi.org/10.2478/v10086-012-0024-0>
- Arnot, J. A., & Gobas, F. A. (2006). A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 14(4), 257-297. <https://doi.org/10.1139/a06-005>.
- Arrigo, F., Impellitteri, F., Piccione, G., & Faggio, C. (2023). Phthalates and their effects on human health: Focus on erythrocytes and the reproductive system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 270, 109645. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109645>.

- Artal-Sanz, M., Samara, C., Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2006). Lysosomal biogenesis and function is critical for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology*, 173(2), 231-239. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511103>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2023.100205>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137634>
- Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Peyrot, C., Wilkinson, K. J., & Gagné, F. (2020). Toxicological effects of inorganic nanoparticle mixtures in freshwater mussels. *Environments*, 7(12), 109. <https://doi.org/10.3390/environments7120109>.
- Auffret, M. (1988). Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 101-107. <https://www.jstor.org/stable/24827569>
- Augustsson, A., Lennqvist, T., Osbeck, C. M., Tibblin, P., Glynn, A., Nguyen, M. A., ... & Vestergren, R. (2021). Consumption of freshwater fish: A variable but significant risk factor for PFOS exposure. *Environmental research*, 192, 110284. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110284>
- Azevedo, C. C., Guzmán-Guillén, R., Martins, J. C., Osório, H., Vasconcelos, V., da Fonseca, R. R., & Campos, A. (2015). Proteomic profiling of gill GSTs in *Mytilus galloprovincialis* from the North of Portugal and Galicia evidences variations at protein isoform level with a possible relation with water quality. *Marine environmental research*, 110, 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.08.008>.
- Babich, H., & Borenfreund, E. (1990). Applications of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. *Alternatives to Laboratory Animals*, 18(1_part_1), 129-144. <https://doi.org/10.1177/026119299001800116.1>
- Bakhmet, I., Fokina, N., & Ruokolainen, T. (2021). Changes of heart rate and lipid composition in *Mytilus edulis* and *Modiolus modiolus* caused by crude oil pollution and low salinity effects. *Journal of Xenobiotics*, 11(2), 46-60. <https://doi.org/10.3390/jox11020004>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.08.009>

- Banaee, M., Impellitteri, F., Evaz-Zadeh Samani, H., Piccione, G., & Faggio, C. (2022). Dietary arthrospira platensis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a means to reduce threats caused by CdCl₂ exposure?. *Toxics*, 10(12), 731. <https://doi.org/10.3390/toxics10120731>
- 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. <https://doi.org/10.3390/toxics11090737>
- Banaee, M., Zeidi, A., Sinha, R., & Faggio, C. (2023). Individual and combined toxic effects of Nano-ZnO and polyethylene microplastics on mosquito fish (*Gambusia holbrooki*). *Water*, 15(9), 1660. <https://doi.org/10.3390/w15091660>
- Bank, M. S., Ok, Y. S., & Swarzenski, P. W. (2020). Microplastic's role in antibiotic resistance. *Science*, 369(6509), 1315-1315. <https://doi.org/10.1126/science.abd9937>.
- Barbier, E. B., Hacker, S. D., Kennedy, C., Koch, E. W., Stier, A. C., & Silliman, B. R. (2011). The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological monographs*, 81(2), 169-193. <https://doi.org/10.1890/10-1510.1>
- Barhoumi, B., Sander, S. G., Driss, M. R., & Tolosa, I. (2022). Survey of legacy and emerging per- and polyfluorinated alkyl substances in Mediterranean seafood from a North African ecosystem. *Environmental Pollution*, 292, 118398. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118398>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.014>
- Barrett, A. J. (1977). Cathepsin D and other carboxyl proteinases. *Proteinases in mammalian cells and tissues*.
- Barrowclough, D., & Birkbeck, C. D. (2022). Transforming the global plastics economy: the role of economic policies in the global governance of plastic pollution. *Social Sciences*, 11(1), 26. <https://doi.org/10.3390/socsci11010026>.
- Bartelt-Hunt, S. L., Snow, D. D., Damon, T., Shockley, J., & Hoagland, K. (2009). The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environmental Pollution*, 157(3), 786-791. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.025>
- Beestman, G. B., & Deming, J. M. (1974). Dissipation of Acetanilide Herbicides from Soils 1. *Agronomy journal*, 66(2), 308-311. <https://doi.org/10.2134/agronj1974.00021962006600020035x>
- Bella, G. D., Russo, E., & Dugo, G. (2017). Heavy metals and persistent organic pollutants in marine organisms from two Sicilian protected areas: strait of Messina and Cape Peloro

lakes. *Current Organic Chemistry*, 21(5), 387-394.
<https://doi.org/10.2174/1385272820666161017164744>

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, 22382-22392. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9861-0>

Berger, U., Glynn, A., Holmström, K. E., Berglund, M., Ankarberg, E. H., & Törnkvist, A. (2009). Fish consumption as a source of human exposure to perfluorinated alkyl substances in Sweden—Analysis of edible fish from Lake Vättern and the Baltic Sea. *Chemosphere*, 76(6), 799-804. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.044>

Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(4), 758-774. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.033>

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, 22(1), 25-34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>

Bhardwaj, S. P., & Singh, S. (2008). Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC–MS and development of a validated stability-indicating assay method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 46(1), 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.09.014>

Bhattacharya, R., Chatterjee, A., Chatterjee, S., & Saha, N. C. (2021). Oxidative stress in benthic oligochaete worm, *Tubifex tubifex* induced by sublethal exposure to a cationic surfactant cetylpyridinium chloride and an anionic surfactant sodium dodecyl sulfate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 240, 108906. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108906>

Bignell, J. P., Stentiford, G. D., Taylor, N. G. H., & Lyons, B. P. (2011). Histopathology of mussels (*Mytilus* sp.) from the Tamar estuary, UK. *Marine environmental research*, 72(1-2), 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.05.004>

Bilal, M., Iqbal, H. M., & Barceló, D. (2019). Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems. *Science of The Total Environment*, 695, 133896. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133896>

Blanchoud, H., Farrugia, F., & Mouchel, J. M. (2004). Pesticide uses and transfers in urbanised catchments. *Chemosphere*, 55(6), 905-913. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.11.061>

- Bojarski, B. A. R. T. O. S. Z., Jakubiak, M., & Witeska, M. (2018). Physiological and histological effects of herbicides in fish. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Animal Science*, (57 [3]. <https://doi.org/10.22630/AAS.2018.57.3.20>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05512>
- Bolognesi, C., Fenech, M., 2012. Mussel micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 7 (6), 1125–1137. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.043>.
- Bondi, C. A., Marks, J. L., Wroblewski, L. B., Raatikainen, H. S., Lenox, S. R., & Gebhardt, K. E. (2015). Human and environmental toxicity of sodium lauryl sulfate (SLS): evidence for safe use in household cleaning products. *Environmental health insights*, 9, EHI-S31765. <https://doi.org/10.4137/EHI.S31765>.
- Bonnafé, E., Sroda, S., Budzinski, H., Valière, A., Pedelluc, J., Marty, P., & Geret, F. (2015). Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 11033-11046. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4309-x>.
- Bouron, A., Oberwinkler, J., 2014. Contribution of calcium-conducting channels to the transport of zinc ions. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 466 (3), 381–387. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1295-z>.
- Bousseba, M., Ferraj, L., Ouahb, S., Ouizgane, A., El Moujtahid, A., Droussi, M., & Hasnaoui, M. (2020). Food preferences of Pike Perch, *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758) in Morocco. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 150, p. 02011). EDP Sciences.
- Bozhkov, A. I., Sidorov, V. I., Alboqai, O. K., Akzhyhitov, R. A., Kurguzova, N. I., Malyshev, A. B., ... & Gromovoi, T. Y. (2021). The role of metallothioneins in the formation of hierarchical mechanisms of resistance to toxic compounds in young and old animals on the example of copper sulfate. *Translational Medicine of Aging*, 5, 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2021.11.001>.
- Breitwieser, M., Viricel, A., Graber, M., Murillo, L., Becquet, V., Churlaud, C., ... & Thomas-Guyon, H. (2016). Short-term and long-term biological effects of chronic chemical contamination on natural populations of a marine bivalve. *PLoS One*, 11(3), e0150184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150184>
- Brinch, A., Jensen, A. A., & Christensen, F. (2018). *Survey of Chemical Substances in Consumer Products-Risk Assessment of Fluorinated Substances in Cosmetic Products* No. 169.
- Bromage, N. R., & Fuchs, A. (1976). A histological study of the response of the interrenal cells of the goldfish (*Carassius auratus*) to treatment with sodium lauryl sulphate. *Journal of Fish Biology*, 9(6), 529-535. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1976.tb04702.x>

- Brown, J.A., Hazon, N., 2019. The Renin-Angiotensin Systems of Fish and their Roles in Osmoregulation, Fish Osmoregulation. CRC Press, pp. 85–134. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1976.tb04702.x>
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental science & technology*, 45(21), 9175-9179. <https://doi.org/10.1021/es201811s>.
- Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current biology*, 23(23), 2388-2392. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.012>
- Brumovský, M., Karásková, P., Borghini, M., & Nizzetto, L. (2016). Per- and polyfluoroalkyl substances in the Western Mediterranean Sea waters. *Chemosphere*, 159, 308-316. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.015>
- Bucci, K., Tulio, M., & Rochman, C. M. (2020). What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review. *Ecological Applications*, 30(2), e02044. <https://doi.org/10.1002/eap.2044>.
- Buck, R. C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J. M., Cousins, I. T., De Voogt, P., ... & van Leeuwen, S. P. (2011). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integrated environmental assessment and management*, 7(4), 513-541. <https://doi.org/10.1002/ieam.258>
- Buck, R. C., Korzeniowski, S. H., Laganis, E., & Adamsky, F. (2021). Identification and classification of commercially relevant per- and poly-fluoroalkyl substances (PFAS). *Integrated environmental assessment and management*, 17(5), 1045-1055. <https://doi.org/10.1002/ieam.4450>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.036>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.042>
- 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., Ilizaliturri-Hernández, C. A., & Faggio, C. (2024). Fate and transportation of pharmaceutical residues and PPCPs in the aquatic system: physiological effects and hazards. *Pharmaceuticals in Aquatic Environments*, 31-52.

- Burnett, N. P., & Sarà, G. (2019). Functional responses of intertidal bivalves to repeated sub-lethal, physical disturbances. *Marine environmental research*, 147, 32-36. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.04.008>
- Campanale, C., Dierkes, G., Massarelli, C., Bagnuolo, G., & Uricchio, V. F. (2020). A relevant screening of organic contaminants present on freshwater and pre-production microplastics. *Toxics*, 8(4), 100. <https://doi.org/10.3390/toxics8040100>.
- Campo, J., Pérez, F., Masiá, A., Picó, Y., la Farré, M., & Barceló, D. (2015). Perfluoroalkyl substance contamination of the Llobregat River ecosystem (Mediterranean area, NE Spain). *Science of the Total Environment*, 503, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.094>
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., & Gallo, G. (2012). Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine environmental research*, 76, 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.085>
- Capillo, G., Silvestro, S., Sanfilippo, M., Fiorino, E., Giangrosso, G., Ferrantelli, V., ... & Faggio, C. (2018). Assessment of electrolytes and metals profile of the Faro Lake (Capo Peloro Lagoon, Sicily, Italy) and its impact on *Mytilus galloprovincialis*. *Chemistry & biodiversity*, 15(5), 1800044. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800044>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117081>
- Cappello, T., Giannetto, A., Parrino, V., Maisano, M., Oliva, S., De Marco, G., ... & Fasulo, S. (2018). Baseline levels of metabolites in different tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 26, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2018.03.005>
- Cara, B., Lies, T., Thimo, G., Robin, L., & Lieven, B. (2022). Bioaccumulation and trophic transfer of perfluorinated alkyl substances (PFAS) in marine biota from the Belgian North Sea: distribution and human health risk implications. *Environmental Pollution*, 311, 119907. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119907>
- Carballal, M. J., López, C., Azevedo, C., & Villalba, A. (1997). In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 7(6), 403-416. <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0094>

- Carballeira, C., Espinosa, J., & Carballeira, A. (2011). Linking $\delta^{15}\text{N}$ and histopathological effects in molluscs exposed in situ to effluents from land-based marine fish farms. *Marine pollution bulletin*, 62(12), 2633-2641. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.034>
- Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M. M., Fernández, C., Alonso, E., & Tarazona, J. V. (2009). Sewage sludge applied to agricultural soil: ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4), 1309-1319. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.01.007>
- Carella, F., Feist, S. W., Bignell, J. P., & De Vico, G. (2015). Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *Journal of invertebrate pathology*, 131, 107-120. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.012>.
- Carrington, D. (2016). Microbeads report reveals loopholes in pledges by biggest firms. *The Guardian*.
- Carrington, E., Waite, J. H., Sara, G., & Sebens, K. P. (2015). Mussels as a model system for integrative ecomechanics. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 443-469.
- Carson, H. S., Nerheim, M. S., Carroll, K. A., & Eriksen, M. (2013). The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. *Marine pollution bulletin*, 75(1-2), 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.054>
- Casellas, A. M., Guardiola, H., & Renaud, F. L. (1991). Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. *Neuropeptides*, 18(1), 35-40. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(91\)90161-B](https://doi.org/10.1016/0143-4179(91)90161-B)
- Cássio, F., Batista, D., & Pradhan, A. (2022). Plastic interactions with pollutants and consequences to aquatic ecosystems: what we know and what we do not know. *Biomolecules*, 12(6), 798. <https://doi.org/10.3390/biom12060798>.
- Çelik, M., Diler, A., & Küçükgülmez, A. (2005). A comparison of the proximate compositions and fatty acid profiles of zander (*Sander lucioperca*) from two different regions and climatic conditions. *Food chemistry*, 92(4), 637-641. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.026>
- Chapman, P. M., Allen, H. E., Godtfredsen, K., & Z'Graggen, M. N. (1996). Policy analysis, peer reviewed: evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals. *Environmental science & technology*, 30(10), 448A-452A. <https://doi.org/10.1021/es962436d>.
- ChemSec- International Chemical Secretariat, 2019. Replacing Phthalates. Available at: <https://chemsec.org/publication/endocrine-disruptors,substitution/replacing-phthalates/> (Accessed on 13 January 2023).
- Chen, D., Yu, W., Hao, Z., Qiu, M., Cui, J., Tang, Y., ... & Liu, H. (2024). Molecular mechanism of selenium against lead-induced apoptosis in chicken brainstem relating to heat shock protein, selenoproteins, and inflammatory cytokines. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 272, 116028. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116028>

- Chen, R., Hong, X., Yan, S., & Zha, J. (2020). Three organophosphate flame retardants (OPFRs) reduce sperm quality in Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Environmental Pollution*, 263, 114525. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114525>.
- Cheng, Z., Nie, X. P., Wang, H. S., & Wong, M. H. (2013). Risk assessments of human exposure to bioaccessible phthalate esters through market fish consumption. *Environment international*, 57, 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.04.005>.
- Chi, C. F., Zhang, J. S., Wu, C. W., Xu, M. Y., & Wang, B. (2012). Analysis and evaluation of nutrition composition of mussel. *Advanced Materials Research*, 554, 1455-1458. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.554-556.1455>
- Chiesa, L. M., Pavlovic, R., Arioli, F., Nobile, M., Di Cesare, F., Mosconi, G., ... & Panseri, S. (2022). Presence of perfluoroalkyl substances in Mediterranean sea and North Italian lake fish addressed to Italian consumer. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(2), 1303-1316. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15532>
- Chirani, M. R., Kowsari, E., Teymourian, T., & Ramakrishna, S. (2021). Environmental impact of increased soap consumption during COVID-19 pandemic: Biodegradable soap production and sustainable packaging. *Science of the Total Environment*, 796, 149013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149013>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105320>
- Choi, S. Y., Kim, Y. H., Lee, Y. K., & Kim, K. T. (2001). Chlorpromazine inhibits store-operated calcium entry and subsequent noradrenaline secretion in PC12 cells. *British journal of pharmacology*, 132(2), 411-418. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703840>.
- Christensen, K. Y., Raymond, M., Blackowicz, M., Liu, Y., Thompson, B. A., Anderson, H. A., & Turyk, M. (2017). Perfluoroalkyl substances and fish consumption. *Environmental research*, 154, 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.032>
- Cledón, M. (2004). *Reproductive biology and ecology of Adelomelon brasiliana (Mollusca: Gastropoda) off Buenos Aires, Argentina* (Doctoral dissertation, Ph. D thesis, FB 2 Biology/Chemistry Univ. Bremen).
- Clegg, B. S., Frank, R., Ritcey, G. M., Souza-Machado, V., & Benoit, D. L. (1991). Propachlor and N-isopropylaniline residues in onions (*Allium cepa*) and muck soils. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 47, 104-111. <https://doi.org/10.1007/BF01689460>
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(3), 309-315. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00141-6)

Cobellis, L., Colacurci, N., Trabucco, E., Carpentiero, C., & Grumetto, L. (2009). Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomedical Chromatography*, 23(11), 1186-1190. <https://doi.org/10.1002/bmc.1241>.

Coccia, P. F., & Westerfeld, W. W. (1967). The metabolism of chlorpromazine by liver microsomal enzyme systems. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 157(2), 446-458.

Codex Alimentarius, 2021. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CX/MRL 2.

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin*, 62(12), 2588-2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>

Colles, A., Bruckers, L., Den Hond, E., Govarts, E., Morrens, B., Schettgen, T., ... & van Larebeke, N. (2020). Perfluorinated substances in the Flemish population (Belgium): levels and determinants of variability in exposure. *Chemosphere*, 242, 125250. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125250>

Collier, P. J., Ramsey, A., Waigh, R. D., Douglas, K. T., Austin, P., & Gilbert, P. (1990). Chemical reactivity of some isothiazolone biocides. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(4), 578-584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01551.x>

Colón, I., Caro, D., Bourdony, C. J., & Rosario, O. (2000). Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environmental health perspectives*, 108(9), 895-900. <https://doi.org/10.1289/ehp.108-2556932>.

Coltro, L., Pitta, J. B., & Madaleno, E. (2013). Performance evaluation of new plasticizers for stretch PVC films. *Polymer Testing*, 32(2), 272-278. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.11.009>

Commission Regulation (EU) 2024/3190 of 19 December 2024 on the use of bisphenol A (BPA) and other bisphenols and bisphenol derivatives with harmonised classification for specific hazardous properties in certain materials and articles intended to come into contact with food, amending Regulation (EU) No 10/2011 and repealing Regulation (EU) 2018/213. <http://data.europa.eu/eli/reg/2024/3190/oj>

Commission Regulation (EU) 2022/1428 of 24 August 2022 laying down methods of sampling and analysis for the control of perfluoroalkyl substances in certain foodstuffs (Text with EEA relevance). http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2022/1428/oj

Commission Regulation (EU) 2022/2388 of 7 December 2022 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of perfluoroalkyl substances in certain foodstuffs.

Commission Regulation (EU) 2024/2462 of 19 September 2024 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council as regards

undecafluorohexanoic acid (PFHxA), its salts and PFHxA-related substances.
<http://data.europa.eu/eli/reg/2024/2462/oj>

Conder, J. M., Hoke, R. A., Wolf, W. D., Russell, M. H., & Buck, R. C. (2008). Are PFCAs bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds. *Environmental science & technology*, 42(4), 995-1003.
<https://doi.org/10.1021/es070895g>

Confcommercio. [Il commercio in Italia ai tempi del Covid | Confcommercio](#)

Connor, W. E. (1997). The beneficial effects of omega-3 fatty acids: cardiovascular disease and neurodevelopment. *Current Opinion in Lipidology*, 8(1), 1-3.

Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., & Wiegand, C. (2011). Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic toxicology*, 105(3-4), 428-437.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.017>

Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., & Wiegand, C. (2010). The β -receptor blocker metoprolol alters detoxification processes in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environmental pollution*, 158(6), 2059-2066.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.03.012>

Cortes-Diaz, M. J. A., Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., Dublán-García, O., & Gómez-Oliván, L. M. (2017). Sublethal effects induced by captopril on *Cyprinus carpio* as determined by oxidative stress biomarkers. *Science of the Total Environment*, 605, 811-823. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.208>

Cortez, F. S., da Silva Souza, L., Guimarães, L. L., Almeida, J. E., Pusceddu, F. H., Maranhão, L. A., ... & Pereira, C. D. S. (2018). Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel *Perna perna* and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil). *Science of the Total Environment*, 637, 1363-1371. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.069>

Cosmetic Ingredient Review (CIR), 1983. Final report on the safety assessment of sodium lauryl sulfate and ammonium lauryl sulfate. *Int. J. Toxicol.* 2 (7), 127–181.

Cosmetic Ingredient Review (CIR), 2005. Final report on the safety assessment of sodium lauryl sulfate and ammonium lauryl sulfate. *Int. J. Toxicol.* 24 (1), 1–102.

CosmeticaItalia, 2023.
https://www.cosmeticaitalia.it/documenti/a_centrostudi/beauty_report/Rapporto-Annuale-2023.pdf

Costa, H. E., Medeiros, I., Mariana, M., & Cairrao, E. (2025). Maternal–Foetal Effects of Exposure to Bisphenol A: Outcomes and Long-Term Consequences. *Applied Sciences*, 15(2), 697.
<https://doi.org/10.3390/app15020697>

- Costa, P. M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., ... & Costa, M. H. (2011). Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. *Marine pollution bulletin*, 62(1), 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.09.009>
- Costa, P. M., Carreira, S., Costa, M. H., & Caeiro, S. (2013). Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquatic toxicology*, 126, 442-454. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.013>.
- Costa, R., Beccaria, M., Grasso, E., Albergamo, A., Oteri, M., Dugo, P., ... & Mondello, L. (2015). Sample preparation techniques coupled to advanced chromatographic methods for marine organisms investigation. *Analytica Chimica Acta*, 875, 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.032>
- Costa, R., Capillo, G., Albergamo, A., Li Volsi, R., Bartolomeo, G., Bua, G., ... & Spanò, N. (2019). A multi-screening Evaluation of the Nutritional and Nutraceutical Potential of the Mediterranean Jellyfish *Pelagia noctiluca*. *Marine drugs*, 17(3), 172. <https://doi.org/10.3390/md17030172>
- Costa, R., Dugo, P., Navarra, M., Raymo, V., Dugo, G., & Mondello, L. (2010). Study on the chemical composition variability of some processed bergamot (*Citrus bergamia*) essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 25(1), 4-12. <https://doi.org/10.1002/ffj.1949>
- Costanza, J., Lynch, D. G., Boethling, R. S., & Arnot, J. A. (2012). Use of the bioaccumulation factor to screen chemicals for bioaccumulation potential. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(10), 2261-2268. <https://doi.org/10.1002/etc.1944>.
- Costanza, R., d'Arge, R., De Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., ... & Van Den Belt, M. (1998). The value of ecosystem services: putting the issues in perspective. *Ecological economics*, 25(1), 67-72. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(98\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(98)00019-6)
- Costanzo, S. D., Murby, J., & Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine pollution bulletin*, 51(1-4), 218-223. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.10.038>
- Crain, C. M., Halpern, B. S., Beck, M. W., & Kappel, C. V. (2009). Understanding and managing human threats to the coastal marine environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1162(1), 39-62. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04496.x>
- Cravo, A., Silva, S., Rodrigues, J., Cardoso, V. V., Benoliel, M. J., Correia, C., ... & Almeida, C. M. (2022). Understanding the bioaccumulation of pharmaceutical active compounds by clams *Ruditapes decussatus* exposed to a UWWTP discharge. *Environmental Research*, 208, 112632. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112632>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104314>

- Cserhádi, T., Forgács, E., & Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment international*, 28(5), 337-348. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00032-6)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.011>.
- Cui, J., Hao, Z., Zhou, Q., Qiu, M., Liu, Y., Liu, Y., ... & Kang, L. (2023). Chlorpyrifos induced autophagy and mitophagy in common carp livers through AMPK pathway activated by energy metabolism disorder. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 258, 114983. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114983>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109302>
- Curtzwiler, G. W., Silva, P., Hall, A., Ivey, A., & Vorst, K. (2021). Significance of perfluoroalkyl substances (PFAS) in food packaging. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 17(1), 7-12. <https://doi.org/10.1002/ieam.4346>
- Dallinger, R. (2022). Cadmium has driven the evolution of metal-selective snail metallothioneins since 430 million years. *Sci. Rep.: CMBI-Broschüre 2018–2021*, 32–33.
- Dalsgaard, J., John, M. S., Kattner, G., Müller-Navarra, D., & Hagen, W. (2003). Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, 46, 225-340. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(03\)46005-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(03)46005-7)
- Dang, Z., Arena, M., & Kienzler, A. (2021). Fish toxicity testing for identification of thyroid disrupting chemicals. *Environmental Pollution*, 284, 117374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117374>.
- Dao, D. Q., Taamalli, S., Louis, F., Kdouh, D., Srour, Z., Ngo, T. C., ... & Černušák, I. (2023). Hydroxyl radical-initiated decomposition of metazachlor herbicide in the gaseous and aqueous phases: Mechanism, kinetics, and toxicity evaluation. *Chemosphere*, 312, 137234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137234>.
- Darbre, P. D. (2023). Introduction to personal care products. In *Personal Care Products and Human Health* (pp. 3-31). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99684-6.00008-2>
- Darkin, S., McQuillan, J., & Ralph, R. K. (1984). Chlorpromazine: a potential anticancer agent?. *Biochemical and biophysical research communications*, 125(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80352-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80352-6)

- Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environmental health perspectives*, 107(suppl 6), 907-938. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s6907>
- Davies, R. P., & Dobbs, A. J. (1984). The prediction of bioconcentration in fish. *Water research*, 18(10), 1253-1262. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90030-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90030-7).
- den Braver-Sewradj, S. P., van Spronsen, R., & Hessel, E. V. (2020). Substitution of bisphenol A: a review of the carcinogenicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption potential of alternative substances. *Critical reviews in toxicology*, 50(2), 128-147. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1701986>
- de Oliveira, L. L. D., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O., & Nunes, B. (2016). Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, 39(1), 13-21. <https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1029048>
- de Souza, C. O., Valenzuela, C. A., Baker, E. J., Miles, E. A., Rosa Neto, J. C., & Calder, P. C. (2018). Palmitoleic acid has stronger anti-inflammatory potential in human endothelial cells compared to oleic and palmitic acids. *Molecular nutrition & food research*, 62(20), 1800322. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800322>
- De Troch, M., Boeckx, P., Cnudde, C., Van Gansbeke, D., Vanreusel, A., Vincx, M., & Caramujo, M. J. (2012). Bioconversion of fatty acids at the basis of marine food webs: insights from a compound-specific stable isotope analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 465, 53-67. <https://doi.org/10.3354/meps09920>.
- De Vico, G., & Carella, F. (2012). Morphological features of the inflammatory response in molluscs. *Research in veterinary science*, 93(3), 1109-1115. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2012.03.014>
- del Carmen Gómez-Regalado, M., Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E., & Zafra-Gómez, A. (2023). Bioaccumulation/bioconcentration of pharmaceutical active compounds in aquatic organisms: Assessment and factors database. *Science of the Total Environment*, 861, 160638. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022>.
- 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*, 104399. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2024.104399>
- Dennis, N. M., Hossain, F., Subbiah, S., Karnjanapiboonwong, A., Dennis, M. L., McCarthy, C., ... & Anderson, T. A. (2022). Species-and Tissue-Specific Chronic Toxicity Values for Northern Bobwhite Quail (*Colinus virginianus*) Exposed to Perfluorohexane Sulfonic Acid and a Binary Mixture of Perfluorooctane Sulfonic Acid and Perfluorohexane Sulfonic Acid. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(1), 219-229. <https://doi.org/10.1002/etc.5238>

- Denys, S., Fraize-Frontier, S., Moussa, O., Le Bizec, B., Veyrand, B., & Volatier, J. L. (2014). Is the fresh water fish consumption a significant determinant of the internal exposure to perfluoroalkylated substances (PFAS)?. *Toxicology letters*, 231(2), 233-238. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.07.028>
- Desbiolles, F., Malleret, L., Tiliacos, C., Wong-Wah-Chung, P., & Laffont-Schwob, I. (2018). Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: is there a risk for the Mediterranean aquatic environment?. *Science of the Total Environment*, 639, 1334-1348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.351>.
- D'Hollander, W., Van den Acker, M., Bols, P., Lemi re, F., Maes, B., & Bervoets, L. (2012). PERFOOD: perfluoralkylchemicali n in de voedselketen: een beleidsondersteunende risicoanalyse. <https://hdl.handle.net/10067/1077790151162165141>
- Di Bella, G., Cavallaro, N., Lo Turco, V., Furci, P., Rando, R., La Pera, L., & Dugo, G. (2010). Autochthonous clams monitoring of Ganzirri Lake (Sicily). *Environmental monitoring and assessment*, 171, 281-287. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1278-x>.
- Di Bella, G., Pizzullo, G., Bua, G. D., Potort , A. G., Santini, A., & Giacobbe, S. (2018). Mapping toxic mineral contamination: the southern oyster drill, *S. haemastoma* (L., 1767), as evaluable sentinel species. *Environmental monitoring and assessment*, 190, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6380-x>
- Di Bella, G., Porretti, M., Cafarelli, M., Litrenta, F., Potort , A. G., Turco, V. L., ... & Faggio, C. (2023). Screening of phthalate and non-phthalate plasticizers and bisphenols in Sicilian women's blood. *Environmental toxicology and pharmacology*, 100, 104166. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104166>
- Di Bella, G., Potort , A. G., Licata, P., Pellizzeri, V., Ben Mansour, H., Dugo, G., & Lo Turco, V. (2018). Organic contamination in clams, *Venerupis aurea laeta* and *Cerastoderma edule glaucum*, from Sicily (Italy). *Natural product research*, 32(12), 1402-1406. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1350674>.
- Di Bella, G., Russo, E., Potort , A. G., Lo Turco, V., Saija, E., Ben Mansour, H., ... & Dugo, G. (2018). Persistent organic pollutants in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) from Sicily (Italy). *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(2), 282-291. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1372642>.
- Dierickx, P. J. (1999). Glutathione-dependent cytotoxicity of the chloroacetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor in rat and human hepatoma-derived cultured cells. *Cell biology and toxicology*, 15, 325-332. <https://doi.org/10.1023/A:1007619919336>
- Dimitriadis, V. K., Domouhtsidou, G. P., & Cajaraville, M. P. (2004). Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in relation to function. *Journal of Molecular Histology*, 35, 501-509. <https://doi.org/10.1023/b:hijo.0000045952.87268.76>

Domingues, I., Agra, A. R., Monaghan, K., Soares, A. M., & Nogueira, A. J. (2010). Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1), 5-18. <https://doi.org/10.1002/etc.23>.

Domouhtsidou, G. P., & Dimitriadis, V. K. (2001). Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environmental Pollution*, 115(1), 123-137. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00233-5)

Doyle, Mottram, & Stubbs. (1998). Prescribing of ACE inhibitors for cardiovascular disorders in general practice. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 23(2), 133-136. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2710.1998.00144.x>

Duarte, I. A., Reis-Santos, P., Fick, J., Cabral, H. N., Duarte, B., & Fonseca, V. F. (2023). Neuroactive pharmaceuticals in estuaries: occurrence and tissue-specific bioaccumulation in multiple fish species. *Environmental Pollution*, 316, 120531. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120531>

Dudley, K., Liu, X., & De Haan, S. (2017). Chlorpromazine dose for people with schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007778.pub2>

Duis, K., & Coors, A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 2. <http://dx.doi.org/10.1186/s12302-015-0069-y>

Eales, J., Bethel, A., Galloway, T., Hopkinson, P., Morrissey, K., Short, R. E., & Garside, R. (2022). Human health impacts of exposure to phthalate plasticizers: An overview of reviews. *Environment international*, 158, 106903. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106903>

ECHA, 2016. <https://echa.europa.eu/documents/10162/ad151e2f-b765-c69c-ef8e-e9d996e50651>

ECHA, 2021. <https://www.echa.europa.eu/documents/10162/6eb64015-7fc3-9d10-77b7-cae6b11ee67d>

ECHA, <https://chem.echa.europa.eu/100.005.263/dossier-list/reach/dossiers/active?searchText=sodium%20lauryl%20sulfate>

ECHA. (2019). Benzisothiazolinone. European Chemicals Agency.

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 Plasticisers), 2019. Focus on Plasticisers. https://www.plasticisers.org/wp-content/uploads/2019/01/PLASTICISERS_LEAFLET_UPDATE_15012019_for_REPRINT_2019.pdf

Edinoff, A. N., Armistead, G., Rosa, C. A., Anderson, A., Patil, R., Cornett, E. M., ... & Kaye, A. D. (2022). Phenothiazines and their evolving roles in clinical practice: A narrative review. *Health psychology research*, 10(4). <https://doi.org/10.52965/001c.38930>.

EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on Perfluorooctane sulfonate (PFOS), Perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. *EFSA Journal*, 6 (7): 653, 131 pp. Doi: 10.2903/j.efsa.2008.653.

EFSA (European Food Safety Authority). 2018. Scientific Opinion on the risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food. *EFSA Journal*, 16 (12): 5194, 284 pp. Doi: 10.2903/j.efsa.2018.5194.

EFSA (European Food Safety Authority). 2020. Scientific Opinion on the risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA Journal*, 18 (9): 6223, 391pp. Doi: 10.2903/j.efsa.2020.6223.

EFSA (European Food Safety Authority). 2022. Food consumption data. The EFSA Comprehensive European Food Consumption Database. <https://www.efsa.europa.eu/> [last update 15 December 2022; accessed 20 August 2023].

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Schrenk, D.; Bignami, M.; Bodin, L.; Chipman, J. K.; del Mazo, J.; Grasl-Kraupp, B.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L. (Ron); Leblanc, J.; Nebbia, C. S.; Nielsen, E.; Ntzani, E.; Petersen, A.; Sand, S.; Vleminckx, C.; Wallace, H.; Barregård, L.; Ceccatelli, S.; Cravedi, J.; Halldorsson, T. I.; Haug, L. S.; Johansson, N.; Knutsen, H. K.; Rose, M.; Roudot, A.; Van Loveren, H.; Vollmer, G.; Mackay, K.; Riolo, F.; Schwerdtle, T. Scientific Opinion on the Risk to Human Health Related to the Presence of Perfluoroalkyl Substances in Food. *EFSA* 2020, 18 (9). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6223>.

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., ... & Castle, L. (2019). Update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butyl-benzyl-phthalate (BBP), bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) and di-isodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials. *EFSA journal*, 17(12), e05838. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5838>.

Elsayed, O. (2015). *Biodegradation of chloroacetanilide herbicides in wetlands* (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).

EMA, 2015. Background review for sodium laurilsulfate used as an excipient. EMA/CHMP/351898/2014. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/background-review-sodium-laurilsulfate-used-excipient-context-revision-guideline-excipients-label-and-package-leaflet-medicinal-products-human-use-draft-report_en.pdf

Engler, R. E. (2012). The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. *Environmental science & technology*, 46(22), 12302-12315. <https://doi.org/10.1021/es3027105>.

Environmental Protection Agency, 40 Cfr Part 180 [EpaEHqeOppe2018e0763; Frle9999e81] Sodium Lauryl Sulfate; Exemption from the Requirement of A Tolerance, October 2, 2019. Retrieved November 8, 2021, From Federalregister.Gov: <https://www.federalregister.gov/documents/2019/10/02/2019-21121/sodium-lauryl-sulfate-exemptionfrom-the-requirement-of-a-tolerance>

Epa, E. Reregistration eligibility decision (RED) for malathion. *Washington, DC: United States Environmental Protection Agency* (2009).

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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.017>

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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144634>.

EUMOFA, European market observatory for fisheries and aquaculture products, last update: 10-02-2023. <https://www.eumofa.eu/documents/20178/61322/Belgium.pdf>

European Chemicals Agency (ECHA). (2020). Call for evidence. <https://echa.europa.eu/-/five-european-states-call-for-evidence-on-broad-pfas-restriction>

European Commission (2022a) COMMISSION REGULATION (EU) 2022/2388 of 7 December 2022 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of perfluoroalkyl substances in certain foodstuffs. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2022/2388/oj>.

European Commission (2022b) COMMISSION RECOMMENDATION (EU) 2022/1431 of 24 August 2022 on the monitoring of perfluoroalkyl substances in food. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022H1431>

European Commission (EC). (2023). Commission regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing regulation (EC) No 1881/2006. Official Journal of the European Union. L119: 103 - 157. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915>.

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, 396, 1–849.

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. Off. J. Eur. Union L97, 50.

European Commission. (2010). Commission Recommendation (2010/161/EU) of 17 March 2010 on the Monitoring of Perfluoroalkylated Substances in food. *Official Journal of the European Union*, 68, 22-23.

European Food Safety Authority (2020) Scientific opinion on the risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. EFSA J 18(9):e06223

European Food Safety Authority. (2011). Use of the EFSA comprehensive European food consumption database in exposure assessment. *EFSA journal*, 9(3), 2097.

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. <https://doi.org/10.1002/etc.3131>

Fabbri, E., Valbonesi, P., & Franzellitti, S. (2008). HSP expression in bivalves. *Invertebrate Survival Journal*, 5(2), 135-161.

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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.010>.

Faggio, C., Torre, A., Pelle, E., Raffa, F., Villari, V., & Trischitta, F. (2011). Cell volume regulation following hypotonic shock in hepatocytes isolated from *Sparus aurata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(1), 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.002>

Faggio, C., Tsarpali, V., & Dailianis, S. (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: an overview. *Science of the Total Environment*, 636, 220-229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>

FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and Challenges, 2014. 6. C. Small and R. J. Nicholls, J. Coastal Res., 2003, 19, 584–599.

FAO/WHO, Guidelines for Predicting Dietary Intake of Pesticide Residues, World Health Organization, Geneva, 1989, p. 24.

- Farrell, E. D., & Crowe, T. P. (2007). The use of byssus threads by *Mytilus edulis* as an active defence against *Nucella lapillus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(2), 559-564. <https://doi.org/10.1017/S0025315407055622>
- Fawell, J., & Ong, C. N. (2014). Emerging contaminants and the implications for drinking water. In *Water Quality Policy and Management in Asia* (pp. 61-77). Routledge. <https://doi.org/10.1080/07900627.2012.672394>
- Feng, S., Zhang, Y., Gao, F., Li, M., Zhu, L., Wen, H., ... & Xiang, X. (2022). Inhibitory effects of antipsychotic chlorpromazine on the survival, reproduction and population growth other than neurotransmitters of zooplankton in light of global warming. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(23), 16167. <https://doi.org/10.3390/ijerph192316167>
- Fenton, S. E., Ducatman, A., Boobis, A., DeWitt, J. C., Lau, C., Ng, C., ... & Roberts, S. M. (2021). Per- and polyfluoroalkyl substance toxicity and human health review: Current state of knowledge and strategies for informing future research. *Environmental toxicology and chemistry*, 40(3), 606-630. <https://doi.org/10.1002/etc.4890>
- Ficarra, S., Russo, A., Barreca, D., Giunta, E., Galtieri, A., Tellone, E., 2016. Short-term effects of chlorpromazine on oxidative stress in erythrocyte functionality: activation of metabolism and membrane perturbation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2394130 <https://doi.org/10.1155/2016/2394130>.
- Filice, M., Amelio, D., Garofalo, F., David, S., Fucarino, A., Jensen, F. B., ... & Cerra, M. C. (2017). Angiotensin II dependent cardiac remodeling in the eel *Anguilla anguilla* involves the NOS/NO system. *Nitric Oxide*, 65, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.02.007>
- Filice, M., Caferro, A., Amelio, D., Impellitteri, F., Iovine, M. A., Porretti, M., ... & Imbrogno, S. (2024). The effects of ACE inhibitor Enalapril on *Mytilus galloprovincialis*: Insights into morphological and functional responses. *Aquatic Toxicology*, 273, 107014. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.107014>
- Filice, M., Caferro, A., Gattuso, A., Sperone, E., Agnisola, C., Faggio, C., ... & Imbrogno, S. (2024). Effects of environmental hypoxia on the goldfish skeletal muscle: Focus on oxidative status and mitochondrial dynamics. *Journal of Contaminant Hydrology*, 261, 104299. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2024.104299>
- Filice, M., Leo, S., Mazza, R., Amelio, D., Garofalo, F., Imbrogno, S., ... & Gattuso, A. (2021). The heart of the adult goldfish *Carassius auratus* as a target of Bisphenol A: A multifaceted analysis. *Environmental Pollution*, 269, 116177. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116177>
- Filice, M., Mazza, R., Imbrogno, S., Miletì, O., Baldino, N., Barca, A., ... & Cerra, M. C. (2022). An ACE2-Alamandine Axis Modulates the Cardiac Performance of the Goldfish *Carassius auratus* via the NOS/NO System. *Antioxidants*, 11(4), 764. <https://doi.org/10.3390/antiox11040764>

- Filice, M., Reinerio, F. R., Cerra, M. C., Faggio, C., Leonetti, F. L., Micarelli, P., ... & 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. <https://doi.org/10.3390/antiox12020524>.
- Filimonova, V., Goncalves, F., Marques, J. C., De Troch, M., & Goncalves, A. M. (2016). Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: a review. *Ecological indicators*, 67, 657-672. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.044>.
- Flyvholm, M. A. (1991). Contact allergens in registered chemical products. *Contact Dermatitis*, 25(1), 49-56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1991.tb01773.x>
- Fokina, N. N., Ruokolainen, T. R., Nemova, N. N., & Bakhmet, I. N. (2013). Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect. *Biological trace element research*, 154, 217-225. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9727-3>
- Frados J, editor. *Plastics engineering handbook*. 4th ed. New York: Van Nostrand Reinhold; 1976.
- Franko, J., Meade, B. J., Frasc, H. F., Barbero, A. M., & Anderson, S. E. (2012). Dermal penetration potential of perfluorooctanoic acid (PFOA) in human and mouse skin. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75(1), 50-62. <https://doi.org/10.1080/15287394.2011.615108>
- Franzellitti, S., & Fabbri, E. (2005). Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(4), 1157-1163. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.244>
- Franzellitti, S., Buratti, S., Du, B., Haddad, S. P., Chambliss, C. K., Brooks, B. W., & Fabbri, E. (2015). A multibiomarker approach to explore interactive effects of propranolol and fluoxetine in marine mussels. *Environmental pollution*, 205, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.020>
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., & Fabbri, E. (2011). The β -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 101(2), 299-308. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.001>
- Franzellitti, S., Prada, F., Viarengo, A., & Fabbri, E. (2020). Evaluating bivalve cytoprotective responses and their regulatory pathways in a climate change scenario. *Science of the Total Environment*, 720, 137733. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137733>
- Fredriksson, F., Eriksson, U., Kärrman, A., & Yeung, L. W. (2022). Per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in sludge from wastewater treatment plants in Sweden—first findings of novel fluorinated copolymers in Europe including temporal analysis. *Science of The Total Environment*, 846, 157406. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157406>
- Freitas, R., Arrigo, F., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., Soares, A. M., ... & Faggio, C. (2023). Combined effects of temperature rise and sodium lauryl sulfate in the Mediterranean

mussel. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 100, 104132. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104132>

Freitas, R., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., Soares, A. M., Pretti, C., & Faggio, C. (2021). The influence of salinity on sodium lauryl sulfate toxicity in *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 87, 103715. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103715>

Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Costa, S., Meucci, V., Battaglia, F., ... & Faggio, C. (2020a). Toxic impacts induced by Sodium lauryl sulfate in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 242, 110656. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110656>

Freitas, R., Silvestro, S., Pagano, M., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., ... & Faggio, C. (2020). Impacts of salicylic acid in *Mytilus galloprovincialis* exposed to warming conditions. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, 103448. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103448>

Freites, L., Fernández-Reiriz, M. J., & Labarta, U. (2002). Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(2), 453-461. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00057-X)

Fujii, Y., Harada, K. H., & Koizumi, A. (2013). Occurrence of perfluorinated carboxylic acids (PFCAs) in personal care products and compounding agents. *Chemosphere*, 93(3), 538-544. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.049>

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. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.047>

Gaw, S., Thomas, K., & Hutchinson, T. H. (2015). Pharmaceuticals in the marine environment. <https://doi.org/10.1039/9781782622345-00070>

Genuis, S. J., Beesoon, S., Birkholz, D., & Lobo, R. A. (2012). Human excretion of bisphenol A: blood, urine, and sweat (BUS) study. *Journal of environmental and public health*, 2012(1), 185731. <https://doi.org/10.1155/2012/185731>

Gervasini, G., Caballero, M. J., Carrillo, J. A., & Benitez, J. (2013). Comparative cytochrome p450 in vitro inhibition by atypical antipsychotic drugs. *International Scholarly Research Notices*, 2013(1), 792456. <https://doi.org/10.1155/2013/792456>.

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. <https://doi.org/10.1039/C5EM00207A>.

- Gielen, G. J., van den Heuvel, M. R., Clinton, P. W., & Greenfield, L. G. (2009). Factors impacting on pharmaceutical leaching following sewage application to land. *Chemosphere*, 74(4), 537-542. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.048>
- Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I. T., DeWitt, J. C., Goldenman, G., Herzke, D., ... & Wang, Z. (2020). An overview of the uses of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22(12), 2345-2373. <https://doi.org/10.1039/D0EM00291G>
- Godin, B., & Tuitou, E. (2007). Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced drug delivery reviews*, 59(11), 1152-1161. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.07.004>
- Godoy, A. A., Kummrow, F., & Pamplin, P. A. Z. (2015). Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment-a review. *Chemosphere*, 138, 281-291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.024>
- Gokul, T., Kumar, K. R., Veeramanikandan, V., Arun, A., Balaji, P., & Faggio, C. (2023). Impact of particulate pollution on aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 100, 104146. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104146>.
- Gomes, T., Pereira, C. G., Cardoso, C., Pinheiro, J. P., Cancio, I., & Bebianno, M. J. (2012). Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology*, 118, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.017>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.161>
- Goodrow, S. M., Ruppel, B., Lippincott, R. L., Post, G. B., & Procopio, N. A. (2020). Investigation of levels of perfluoroalkyl substances in surface water, sediment and fish tissue in New Jersey, USA. *Science of the Total Environment*, 729, 138839. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138839>
- Gorga, M., Petrovic, M., & Barceló, D. (2013). Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1295, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.028>
- Gorochategui, E., Pérez-Albaladejo, E., Casas, J., Lacorte, S., & Porte, C. (2014). Perfluorinated chemicals: differential toxicity, inhibition of aromatase activity and alteration of cellular lipids in human placental cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 277(2), 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.03.012>

Gouin, T., Avalos, J., Brunning, I., Brzuska, K., De Graaf, J., Kaumanns, J., ... & Wolf, T. (2015). Use of micro-plastic beads in cosmetic products in Europe and their estimated emissions to the North Sea environment. *SOFWJ*, 141(4), 40-46.

Grienke, U., Silke, J., & Tasdemir, D. (2014). Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food chemistry*, 142, 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.027>

Groffen, T., Lopez-Antia, A., D'Hollander, W., Prinsen, E., Eens, M., & Bervoets, L. (2017). Perfluoroalkylated acids in the eggs of great tits (*Parus major*) near a fluorochemical plant in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution*, 228, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.007>

Gugliandolo, E., Licata, P., Crupi, R., Albergamo, A., Jebara, A., Lo Turco, V., ... & Di Bella, G. (2020). Plasticizers as microplastics tracers in Tunisian marine environment. *Frontiers in Marine Science*, 7, 589398. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.589398>

GuideChem. Sodium Dodecyl Sulfate (CAS 151-21-3) MSDS. Available at: <http://www.guidechem.com/msds/151-21-3.html>. Accessed August 19, 2015

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)

Haj, Y., Bohn, S., Souza, M.M., 2019. Tolerance of native and invasive bivalves under herbicide and metal contamination: an ex vivo approach. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26 (30), 31198–31206. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06256-x>.

Haller, C. A. (2010). Nutraceuticals: has there been any progress?. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 87(2).

Halling-Sørensen, B. N. N. S., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lützhøft, H. H., & Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere*, 36(2), 357-393. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8)

Hamaguchi, R., Haginaka, J., Tanimoto, T., & Kuroda, Y. (2014). Maintenance of luminal pH and protease activity in lysosomes/late endosomes by vacuolar ATPase in chlorpromazine-treated RAW264 cells accumulating phospholipids. *Cell biology and toxicology*, 30, 67-77. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9269-2>

Hamed, H. S., Ismal, S. M., & Faggio, C. (2021). Effect of allicin on antioxidant defense system, and immune response after carbofuran exposure in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 240, 108919. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108919>

Hamer, B., Hamer, D. P., Müller, W. E. G., & Batel, R. (2004). Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environment international*, 30(7), 873-882. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.008>

Hatvani, L. (2013). The complete degradation of acetanilide by a consortium of microbes isolated from River Maros. *Acta Biologica Szegediensis*, 57(2), 117-120. <https://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2802>

Hawash, H. B., Moneer, A. A., Galhoum, A. A., Elgarahy, A. M., Mohamed, W. A., Samy, M., ... & Attia, N. F. (2023). Occurrence and spatial distribution of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment, their characteristics, and adopted legislations. *Journal of Water Process Engineering*, 52, 103490. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103490>

He, Y., Miao, M., Herrinton, L. J., Wu, C., Yuan, W., Zhou, Z., & Li, D. K. (2009). Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environmental research*, 109(5), 629-633. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.04.003>

Hekster, F. M., Laane, R. W., & De Voogt, P. (2003). Environmental and toxicity effects of perfluoroalkylated substances. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 99-121. https://doi.org/10.1007/0-387-21731-2_4

Hemmer, M. J., Middaugh, D. P., & Comparella, V. (1992). Comparative acute sensitivity of larval topsmelt, *Atherinops affinis*, and inland silverside, *Menidia beryllina*, to 11 chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 11(3), 401-408. <https://doi.org/10.1002/etc.5620110314>

Henderson, R. J., & Sargent, J. R. (1983). Studies on the effects of di-2-ethylhexyl phthalate on lipid metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed zooplankton rich in wax esters. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 74(2), 325-330. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(83\)90109-3](https://doi.org/10.1016/0742-8413(83)90109-3).

Hernandez, L. M., Yousefi, N., & Tufenkji, N. (2017). Are there nanoplastics in your personal care products?. *Environmental Science & Technology Letters*, 4(7), 280-285. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00187>

Hoa, N. T. Q., Lieu, T. T., Anh, H. Q., Huong, N. T. A., Nghia, N. T., Chuc, N. T., ... & Tuyen, L. H. (2022). Perfluoroalkyl substances (PFAS) in freshwater fish from urban lakes in Hanoi, Vietnam: concentrations, tissue distribution, and implication for risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(34), 52057-52069. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19532-0>

Hodkovicova, N., Hollerova, A., Svobodova, Z., Faldyna, M., & Faggio, C. (2022). Effects of plastic particles on aquatic invertebrates and fish—a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 96, 104013. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.104013>.

Hoff, P. T., Van Campenhout, K., Van de Vijver, K., Covaci, A., Bervoets, L., Moens, L., ... & De Coen, W. (2005). Perfluorooctane sulfonic acid and organohalogen pollutants in liver of three

freshwater fish species in Flanders (Belgium): relationships with biochemical and organismal effects. *Environmental pollution*, 137(2), 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.01.008>

Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., & Pedersen, S. F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiological reviews*, 89(1), 193-277. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2007>

Högberg, J., Hanberg, A., Berglund, M., Skerfving, S., Remberger, M., Calafat, A. M., ... & Håkansson, H. (2008). Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environmental health perspectives*, 116(3), 334-339. <https://doi.org/10.1289/ehp.10788>.

Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Yamazaki, S., & Morita, M. (1995). Imposex in Japanese gastropods (*Neogastropoda* and *Mesogastropoda*): effects of tributyltin and triphenyltin from antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4-12), 402-405. [https://doi.org/10.1016/0025326X\(95\)00133-8](https://doi.org/10.1016/0025326X(95)00133-8)

Houlihan, D. F., Livingstone, D. R., Lee, R. F., & Livingstone, D. R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Advances in Comparative and Environmental Physiology: Volume 7*, 45-185. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75897-3_2

Hvězdová, M., Kosubová, P., Košíková, M., Scherr, K. E., Šimek, Z., Brodský, L., ... & Hofman, J. (2018). Currently and recently used pesticides in Central European arable soils. *Science of the Total Environment*, 613, 361-370. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.049>

IMAP Benzisothiazolinone and Its Salts: Human Health Tier II Assessment. [(accessed on 27 March 2023)]; Available online: https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/Benzisothiazolinone%20and%20its%20salts_Human%20health%20tier%20II%20assessment.pdf

Imbrogno, S., Garofalo, F., Amelio, D., Capria, C., & Cerra, M. C. (2013). Humoral control of cardiac remodeling in fish: role of Angiotensin II. *General and Comparative Endocrinology*, 194, 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.09.009>

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. <https://doi.org/10.3390/ijerph192416830>

Impellitteri, F., Multisanti, C. R., Rusanova, P., Piccione, G., Falco, F., & Faggio, C. (2023). Exploring the impact of contaminants of emerging concern on fish and invertebrates physiology in the Mediterranean Sea. *Biology*, 12(6), 767. <https://doi.org/10.3390/biology12060767>

Impellitteri, F., Riolo, K., Multisanti, C. R., Zicarelli, G., Piccione, G., Faggio, C., & Giannetto, A. (2024). Evaluating quaternium-15 effects on *Mytilus galloprovincialis*: New insights on

physiological and cellular responses. *Science of the Total Environment*, 918, 170568.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170568>

Impellitteri, F., Yunko, K., Calabrese, G., Porretti, M., Martyniuk, V., Gnatyshyna, L., ... & Faggio, C. (2024). Chlorpromazine's impact on *Mytilus galloprovincialis*: a multi-faceted investigation. *Chemosphere*, 350, 141079.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.141079>

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.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2023.1267953>.

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.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164075>.

IQVIA, 2023. <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports-and-publications/reports/the-global-use-of-medicines-2023>

Irvine, G. W., Tan, S. N., & Stillman, M. J. (2017). A simple metallothionein-based biosensor for enhanced detection of arsenic and mercury. *Biosensors*, 7(1), 14.
<https://doi.org/10.3390/bios7010014>

Isani, G., & Carpenè, E. (2014). Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: a long journey from nematodes to mammals. *Biomolecules*, 4(2), 435-457.
<https://doi.org/10.3390/biom4020435>

Ishida, Y., & Kobayashi, H. (1995). Avoidance behavior of carp to pesticides and decrease of the avoidance threshold by addition of sodium lauryl sulfate. *Fisheries science*, 61(3), 441-446.
<https://doi.org/10.2331/fishsci.61.441>

Jauković, Z. D., Grujić, S. D., Vasiljević, T. M., Petrović, S. D., & Laušević, M. D. (2014). Cardiovascular drugs in environmental waters and wastewaters: method optimization and real sample analysis. *Journal of AOAC International*, 97(4), 1167-1174.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-121>

Jebara, A., Albergamo, A., Rando, R., Potorti, 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.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.111967>.

Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M., & Barcelo, D. (2011). Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water research*, 45(3), 1165-1176.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.010>

- Jeong, Y., Da Silva, K. M., Iturrospe, E., Fujii, Y., Boogaerts, T., van Nuijs, A. L., ... & Covaci, A. (2022). Occurrence and contamination profile of legacy and emerging per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in Belgian wastewater using target, suspect and non-target screening approaches. *Journal of Hazardous Materials*, 437, 129378. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129378>
- Jiang, J. Q., Zhou, Z., & Sharma, V. K. (2013). Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water—A review from global views. *Microchemical Journal*, 110, 292-300. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.04.014>
- Jiménez, J. J., Muñoz, B. E., Sánchez, M. I., Pardo, R., & Vega, M. S. (2016). Fate of the drug chlorpromazine in river water according to laboratory assays. Identification and evolution over time of degradation products. Sorption to sediment. *Chemosphere*, 162, 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.107>.
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28419>
- Joerss, H., & Menger, F. (2023). The complex 'PFAS world'-how recent discoveries and novel screening tools reinforce existing concerns. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 40, 100775. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2023.100775>
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., & Grimme, L. H. (2003). Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 59(10), 1101-1110. <https://doi.org/10.1002/ps.735>
- Kahle, M., Buerge, I. J., Hauser, A., Muller, M. D., & Poiger, T. (2008). Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environmental Science & Technology*, 42(19), 7193-7200. <https://doi.org/10.1021/es8009309>.
- Kanakaraju, D., Glass, B. D., & Oelgemöller, M. (2014). Titanium dioxide photocatalysis for pharmaceutical wastewater treatment. *Environmental chemistry letters*, 12, 27-47. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0428-0>
- Kannan, M., Bojan, N., Swaminathan, J., Zicarelli, G., Hemalatha, D., Zhang, Y., ... & Faggio, C. (2023). Nanopesticides in agricultural pest management and their environmental risks: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(9), 10507-10532. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04795-y>
- Karaman, Y., & Menek, N. (2012). Investigation of electrochemical behavior of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[N-propyl-N-(3-sulfopropyl) amino] phenol disodium salt dihydrate. *Journal of The Electrochemical Society*, 159(10), H805. <https://doi.org/10.1149/2.031210jes>

- 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, 36046-36063. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3508-7>
- Kasavan, S., Yusoff, S., Fakri, M. F. R., & Siron, R. (2021). Plastic pollution in water ecosystems: A bibliometric analysis from 2000 to 2020. *Journal of Cleaner Production*, 313, 127946. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127946>.
- Kaushal, V., Herzog, C., Haun, R. S., & Kaushal, G. P. (2014). Caspase protocols in mice. *Caspases, Paracaspases, and Metacaspases: Methods and Protocols*, 141-154. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0357-3_9.
- Keawmanee, S., Piyaviriyakul, P., Boontanon, N., Waiyarat, S., Sukeesan, S., Kongpran, J., & Boontanon, S. K. (2024). Concentration and health risk assessment of per-and polyfluoroalkyl substances in cosmetic and personal care products. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 59(9), 551-561. <https://doi.org/10.1080/03601234.2024.2384234>
- Kelly, J. R., & Scheibling, R. E. (2012). Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Marine Ecology Progress Series*, 446, 1-22. <https://doi.org/10.3354/meps09559>.
- Khan, B., Burgess, R. M., & Cantwell, M. G. (2023). Occurrence and bioaccumulation patterns of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the marine environment. *ACS ES&T Water*, 3(5), 1243-1259. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00296>
- Khan, B., Ho, K. T., & Burgess, R. M. (2020). Application of biomarker tools using bivalve models toward the development of adverse outcome pathways for contaminants of emerging concern. *Environmental toxicology and chemistry*, 39(8), 1472-1484. <https://doi.org/10.1002/etc.4757>
- Khoma, V. V., Gnatyshyna, L. L., Martyniuk, V. V., Mackiv, T. R., Mishchuk, N. Y., & Stoliar, O. B. (2020a). Metallothioneins contribution to the response of bivalve mollusk to xenobiotics. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 92(5), 87-96. <https://doi.org/10.15407/ubj92.05.087>
- Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackiv, T., Mishchenko, L., Manusadžianas, L., & Stoliar, O. (2021). Common and particular biochemical responses of *Unio tumidus* to herbicide, pharmaceuticals and their combined exposure with heating. *Ecotoxicology and environmental safety*, 208, 111695. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111695>
- Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackiv, T., Yunko, K., Formanchuk, R., ... & Stoliar, O. (2020b). Combined exposures to low Roundup concentration induce thiolome response in bivalve mollusk. *Scientific Issue Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University. Series: Biology*, 80(3-4), 72-78. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.20.3-4.9>
- Khoma, V., Martinyuk, V., Matskiv, T., Gnatyshyna, L., Baranovsky, V., Gladiuk, M., ... & Stoliar, O. (2022a). Environmental concentrations of Roundup in combination with chlorpromazine or heating causes biochemical disturbances in the bivalve mollusc *Unio tumidus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16775-1>.

Khoma, V., Martinyuk, V., Matskiv, T., Yunko, K., Gnatyshyna, L., & Stoliar, O. (2022b). Does roundup affect zinc functions in a bivalve mollusk in ex vivo exposure?. *Ecotoxicology*, 31(2), 335-340. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02512-4>.

Kiefer, K., Du, L., Singer, H., & Hollender, J. (2021). Identification of LC-HRMS nontarget signals in groundwater after source related prioritization. *Water Research*, 196, 116994. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116994>.

Kim, Y. W., Kim, M. J., Chung, B. Y., Bang, D. Y., Lim, S. K., Choi, S. M., ... & Lee, B. M. (2013). Safety evaluation and risk assessment of d-limonene. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 16(1), 17-38.

King, N., Latheef, F., & Wilkinson, M. (2021). Trends in preservative allergy: benzisothiazolinone emerges from the pack. *Contact Dermatitis*, 85(6), 637-642. <https://doi.org/10.1111/cod.13968>

Kinney, C. A., Furlong, E. T., Werner, S. L., & Cahill, J. D. (2006). Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(2), 317-326. <https://doi.org/10.1897/05-187R.1>

Klosterhaus, S. L., Grace, R., Hamilton, M. C., & Yee, D. (2013). Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environment international*, 54, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.01.009>

Klotz, A. V., Stegeman, J. J., & Walsh, C. (1984). An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Analytical biochemistry*, 140(1), 138-145. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90144-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90144-1).

Knowles, C. O., McKee, M. J., & Palawski, D. U. (1987). Chronic effects of DI-2-ethylhexyl phthalate on biochemical composition, survival and reproduction of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 6(3), 201-208. <https://doi.org/10.1002/etc.5620060305>

Koch, H. M., Bolt, H. M., & Angerer, J. (2004). Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Archives of toxicology*, 78, 123-130. <https://doi.org/10.1007/s00204-003-0522-3>.

Koehler, A., Marx, U., Broeg, K., Bahns, S., & Bressling, J. (2008). Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas—a new threat to marine life?. *Marine environmental research*, 66(1), 12-14. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.009>

Kolpin, D. W., Thurman, E. M., & Goolsby, D. A. (1995). Occurrence of selected pesticides and their metabolites in near-surface aquifers of the Midwestern United States. *Environmental Science & Technology*, 30(1), 335-340. <https://doi.org/10.1021/es950462q>

- Kolpin, D. W., Thurman, E. M., & Linhart, S. M. (2000). Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates. *Science of the Total Environment*, 248(2-3), 115-122. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00535-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00535-5)
- Kolpin, D. W., Thurman, E. M., Lee, E. A., Meyer, M. T., Furlong, E. T., & Glassmeyer, S. T. (2006). Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment*, 354(2-3), 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.028>
- Konstantinou, I. K., Albanis, T. A., Petrakis, D. E., & Pomonis, P. J. (2000). Removal of herbicides from aqueous solutions by adsorption on Al-pillared clays, Fe–Al pillared clays and mesoporous alumina aluminum phosphates. *Water Research*, 34(12), 3123-3136. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00071-3).
- Köprücü, K., & Aydın, R. (2004). The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80(1), 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.05.004>
- Krauskopf LG. Monomeric plasticizers. In: Wickson EJ, editor. Handbook of PVC formulating. New York: Wiley; 1993.
- Kreżel, A., & Maret, W. (2016). The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 611, 3-19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.010>.
- Kumar, E., Koponen, J., Rantakokko, P., Airaksinen, R., Ruokojärvi, P., Kiviranta, H., ... & Jestoi, M. (2022). Distribution of perfluoroalkyl acids in fish species from the Baltic Sea and freshwaters in Finland. *Chemosphere*, 291, 132688. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132688>
- Kumar, V., Swain, H. S., Roy, S., Das, B. K., Upadhyay, A., Ramteke, M. H., ... & Banerjee, H. (2022). Integrated biomarker approach strongly explaining in vivo sub-lethal acute toxicity of butachlor on *Labeo rohita*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 261, 109427. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.031>.
- Kupper, T., Plagellat, C., Brändli, R. C., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., & Tarradellas, J. (2006). Fate and removal of polycyclic musks, UV filters and biocides during wastewater treatment. *Water research*, 40(14), 2603-2612. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.012>
- Lagerspetz, K. Y. H., Tiiska, A., & Senius, K. E. O. (1993). Low sensitivity of ciliary activity in the gills of *Anodonta cygnea* to some ecotoxicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 105(3), 393-395. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90076-W](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90076-W)
- Lakdawala, P., Blahova, J., & Faggio, C. (2023). Presence and distribution of pharmaceuticals residue in food products and the food chain. In *Pharmaceuticals in aquatic environments* (pp. 53-66). CRC Press.

- Lambropoulou, D. A., Konstantinou, I. K., & Albanis, T. A. (2002). Factors affecting multiresidue determination of priority herbicides when using solid-phase microextraction. *Journal of AOAC International*, 85(2), 486-493. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.2.486>.
- Land, M., De Wit, C. A., Bignert, A., Cousins, I. T., Herzke, D., Johansson, J. H., & Martin, J. W. (2018). What is the effect of phasing out long-chain per-and polyfluoroalkyl substances on the concentrations of perfluoroalkyl acids and their precursors in the environment? A systematic review. *Environmental Evidence*, 7, 1-32. <https://doi.org/10.1186/s13750-017-0114-y>
- Lapen, D. R., Topp, E., Metcalfe, C. D., Li, H., Edwards, M., Gottschall, N., ... & Beck, A. (2008). Pharmaceutical and personal care products in tile drainage following land application of municipal biosolids. *Science of the Total Environment*, 399(1-3), 50-65. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.025>
- 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. <https://doi.org/10.3354/meps13075>
- Latini, G., De Felice, C., Presta, G., Del Vecchio, A., Paris, I., Ruggieri, F., & Mazzeo, P. (2003). Exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate in humans during pregnancy: a preliminary report. *Neonatology*, 83(1), 22-24. <https://doi.org/10.1159/000067012>.
- Lattos, A., Bitchava, K., Giantsis, I. A., Theodorou, J. A., Batargias, C., & Michaelidis, B. (2021). The implication of vibrio bacteria in the winter mortalities of the critically endangered *Pinna nobilis*. *Microorganisms*, 9(5), 922. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050922>
- Lau, W. W., Shiran, Y., Bailey, R. M., Cook, E., Stuchtey, M. R., Koskella, J., ... & Palardy, J. E. (2020). Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. *Science*, 369(6510), 1455-1461. <https://doi.org/10.1126/science.aba9475>
- Leaf, A., & Weber, P.C. (1988). Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *New England Journal of Medicine*, 318, 549. <https://doi.org/10.1056/NEJM198803033180905>
- Leclercq, C., Arcella, D., Piccinelli, R., Sette, S., & Le Donne, C. (2009). The Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005–06: main results in terms of food consumption. *Public health nutrition*, 12(12), 2504-2532. <https://doi.org/10.1017/S1368980009005035>
- Lee, C. S., Shipley, O. N., Ye, X., Fisher, N. S., Gallagher, A. J., Frisk, M. G., ... & Venkatesan, A. K. (2024). Accumulation of Per-and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Coastal Sharks from Contrasting Marine Environments: The New York Bight and The Bahamas. *Environmental Science & Technology*, 58(29), 13087-13098. <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c02044>
- Lee, S., Kwon, B., Jeong, J., Kho, Y., & Ji, K. (2023). Thyroid hormone disrupting potentials of benzisothiazolinone in embryo-larval zebrafish and rat pituitary GH3 cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114406. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114406>

- 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. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4768>.
- Lee, Y. J., Ryu, H. Y., Kim, H. K., Min, C. S., Lee, J. H., Kim, E., ... & Yoon, H. S. (2008). Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reproductive Toxicology*, 25(4), 413-419. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.05.058>
- Lee, Y. S., Lim, J. E., Lee, S., & Moon, H. B. (2020). Phthalates and non-phthalate plasticizers in sediment from Korean coastal waters: occurrence, spatial distribution, and ecological risks. *Marine Pollution Bulletin*, 154, 111119. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111119>
- Lenka, S. P., Kah, M., & Padhye, L. P. (2022). Occurrence and fate of poly-and perfluoroalkyl substances (PFAS) in urban waters of New Zealand. *Journal of Hazardous Materials*, 428, 128257. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128257>
- Lessmann, F., Correia-Sá, L., Calhau, C., Domingues, V. F., Weiss, T., Brüning, T., & Koch, H. M. (2017). Exposure to the plasticizer di (2-ethylhexyl) terephthalate (DEHP) in Portuguese children—Urinary metabolite levels and estimated daily intakes. *Environment international*, 104, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.03.028>
- Levine, R. L., Wehr, N., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E. (2000). Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Stress Response: Methods and Protocols*, 15-24. <https://doi.org/10.1385/1-59259-054-3:15>
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 233, pp. 346-357). Academic press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.021>
- Li, H. (2003). Management of coastal mega-cities—a new challenge in the 21st century. *Marine Policy*, 27(4), 333-337. [https://doi.org/10.1016/S0308-597X\(03\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S0308-597X(03)00045-9)
- Li, P. P., & Ding, X. L. (2006). The manufacture and nutritional analysis of the functional natural sauce from the decoction of *Mytilus edulis*. *China Condiment*, 2, 17-19.
- Li, T., Zhou, Q., Zhang, N., & Luo, Y. (2008). Toxic effects of chlorpromazine on *Carassius auratus* and its oxidative stress. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 43(8), 638-643. <https://doi.org/10.1080/03601230802352674>
- Li, Y., Liang, J., Jiang, C., Cui, J., Hong, L., Hao, Z., ... & Teng, X. (2024). Se alleviated Pb-caused neurotoxicity in chickens: SPS2-GPx1-GSH-IL-2/IL-17-NO pathway, selenoprotein

suppression, oxidative stress, and inflammatory injury. *Antioxidants*, 13(3), 370. <https://doi.org/10.3390/antiox13030370>

Li, Y., Wang, C., Wang, G., & Qu, Z. (2008). Application of the long-chain linear polyester in plastification of PVC. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 23, 100-104. <https://doi.org/10.1007/s11595-006-1100-3>

Lin, T., Zhang, D., Lai, Q., Sun, M., Quan, W., & Zhou, K. (2014). A modified method to detect the phagocytic ability of eosinophilic and basophilic haemocytes in the oyster *Crassostrea plicatula*. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 337-343. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.016>

Lithner, D., Nordensvan, I., & Dave, G. (2012). Comparative acute toxicity of leachates from plastic products made of polypropylene, polyethylene, PVC, acrylonitrile–butadiene–styrene, and epoxy to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1763-1772. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0663-5>.

Liu, C. S., Shih, K., Wei, L., Wang, F., & Li, F. B. (2011). Kinetics and mechanism of propachlor reductive transformation through nucleophilic substitution by dithionite. *Chemosphere*, 85(9), 1438-1443. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.023>

Liu, C., Shih, K., Gao, Y., Li, F., & Wei, L. (2012). Dechlorinating transformation of propachlor through nucleophilic substitution by dithionite on the surface of alumina. *Journal of soils and sediments*, 12, 724-733. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0506-0>.

Liu, J., Lu, G., Xie, Z., Zhang, Z., Li, S., & Yan, Z. (2015). Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. *Science of the Total Environment*, 511, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.033>

Liu, W., Zhao, Y., Shi, Z., Li, Z., & Liang, X. (2020). Ecotoxicoproteomic assessment of microplastics and plastic additives in aquatic organisms: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 36, 100713. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100713>

Liu, Y. E., Tang, B., Liu, Y., Luo, X. J., Mai, B. X., Covaci, A., & Poma, G. (2019). Occurrence, biomagnification and maternal transfer of legacy and emerging organophosphorus flame retardants and plasticizers in water snake from an e-waste site. *Environment International*, 133, 105240. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105240>

Lo Turco, V., Sgrò, B., Albergamo, A., Nava, V., Rando, R., Potortì, A. G., & Di Bella, G. (2023). Assessment of the Accuracy of Nutrition Label and Chemical Composition of Plant-Based Milks Available on the Italian Market. *Foods*, 12(17), 3207. <https://doi.org/10.3390/foods12173207>

Logeshwaran, P., Sivaram, A. K., Surapaneni, A., Kannan, K., Naidu, R., & Megharaj, M. (2021). Exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) but not perfluorooctanoic acid (PFOA) at ppb

concentration induces chronic toxicity in *Daphnia carinata*. *Science of The Total Environment*, 769, 144577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144577>

Lombardo, J., Solomando, A., Cohen-Sánchez, A., Pinya, S., Tejada, S., Ferriol, P., ... & Sureda, A. (2022). Effects of human activity on markers of oxidative stress in the intestine of *Holothuria tubulosa*, with special reference to the presence of microplastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9018. <https://doi.org/10.3390/ijms23169018>

López-Serna, R., Petrović, M., & Barceló, D. (2012). Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Science of the total environment*, 440, 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.027>

Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine drugs*, 9(6), 1056-1100. <https://doi.org/10.3390/md9061056>

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193(1), 265-275.

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. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00091-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00091-9)

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

Ma, X., Zhang, Y., Guan, M., Zhang, W., Tian, H., Jiang, C., ... & Kang, W. (2021). Genotoxicity of chloroacetamide herbicides and their metabolites *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Molecular Medicine*, 47(6), 1-10. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4936>.

Maazouzi, C., Masson, G., Izquierdo, M. S., & Pihan, J. C. (2008). Chronic copper exposure and fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: results from a field study. *Environmental pollution*, 156(1), 221-226. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.12.010>

Maculewicz, J., Kowalska, D., Świacka, K., Toński, M., Stepnowski, P., Białk-Bielińska, A., & Dołzonek, J. (2022). Transformation products of pharmaceuticals in the environment: Their fate,(eco) toxicity and bioaccumulation potential. *Science of the total environment*, 802, 149916. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149916>

Madhyastha, M. N., & Nayak, R. (1984). Effect of a Combination of Pollutants on the Fish *Rasbora Daniconios* (Ham.). In *Studies in Environmental Science* (Vol. 25, pp. 617-628). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0166-1116\(08\)72141-1](https://doi.org/10.1016/S0166-1116(08)72141-1)

Madikizela, L. M., Ncube, S., Tutu, H., Richards, H., Newman, B., Ndungu, K., & Chimuka, L. (2020). Pharmaceuticals and their metabolites in the marine environment: sources, analytical methods and occurrence. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 28, e00104. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00104>.

- Maes, J., Belpaire, C., & Goemans, G. (2008). Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environmental pollution*, 153(1), 223-237. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.07.021>
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J., & Morin, B. (2014). Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquatic Toxicology*, 147, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.024>.
- Maiuolo, J., Carresi, C., Gliozzi, M., Musolino, V., Scarano, F., Coppoletta, A. R., ... & Mollace, V. (2021). Effects of bergamot polyphenols on mitochondrial dysfunction and sarcoplasmic reticulum stress in diabetic cardiomyopathy. *Nutrients*, 13(7), 2476. <https://doi.org/10.3390/nu13072476>
- Mankidy, R., Wiseman, S., Ma, H., & Giesy, J. P. (2013). Biological impact of phthalates. *Toxicology letters*, 217(1), 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>.
- Manojkumar, Y., Pilli, S., Rao, P. V., & Tyagi, R. D. (2023). Sources, occurrence and toxic effects of emerging per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Neurotoxicology and Teratology*, 97, 107174. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2023.107174>
- Marcilla, A., & Beltran, M. (2004). Mechanisms of plasticizers action. *Handbook of plasticizers*, 3.
- Marengo, E., & Aceto, M. (2003). Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines. *Food Chemistry*, 81(4), 621-630. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00564-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00564-2)
- Margot, J., Kienle, C., Magnet, A., Weil, M., Rossi, L., De Alencastro, L. F., ... & Barry, D. A. (2013). Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon?. *Science of the total environment*, 461, 480-498. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.034>
- Marigómez, I., Garmendia, L., Soto, M., Orbea, A., Izagirre, U., & Cajaraville, M. P. (2013). Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill “Mussel Watch”. *Ecotoxicology*, 22, 486-505. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1042-4>.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E., & Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy research and technique*, 56(5), 358-392. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>.

- Martínez, M. L., Intralawan, A., Vázquez, G., Pérez-Maqueo, O., Sutton, P., & Landgrave, R. (2007). The coasts of our world: Ecological, economic and social importance. *Ecological economics*, 63(2-3), 254-272. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2006.10.022>
- Martínez-Gómez, C., Bignell, J., & Lowe, D. (2015). Lysosomal membrane stability in mussels. <https://doi.org/10.25607/OBP-240>.
- Martyniuk, V., Gylytė, B., Matskiv, T., Khoma, V., Tulaidan, H., Gnatyshyna, L., ... & Stoliar, O. (2022). Stress responses of bivalve mollusc *Unio tumidus* from two areas to ibuprofen, microplastic and their mixture. *Ecotoxicology*, 31(9), 1369-1381. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02594-8>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109425>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104068>
- Matijević, G., Babić, S., Maršavelski, A., Stipaničev, D., Repec, S., Čož-Rakovac, R., & Klobučar, G. (2023). Estimating risk of cardiovascular pharmaceuticals in freshwaters using zebrafish embryotoxicity test-statins threat revealed. *Chemosphere*, 313, 137574. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137574>
- Matozzo, V., Fabrello, J., Masiero, L., Ferraccioli, F., Finos, L., Pastore, P., ... & Bogialli, S. (2018). Ecotoxicological risk assessment for the herbicide glyphosate to non-target aquatic species: a case study with the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental pollution*, 233, 623-632. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.100>
- Matozzo, V., Pagano, M., Spinelli, A., Caicci, F., & Faggio, C. (2016). *Pinna nobilis*: a big bivalve with big haemocytes?. *Fish & shellfish immunology*, 55, 529-534. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.039>
- Matthews, G. (1996). PVC: production, properties and uses. The Institute of Materials, ISBN 0901716596.
- Mauro, M., Lazzara, V., Arizza, V., Luparello, C., Ferrantelli, V., Cammilleri, G., ... & Vazzana, M. (2021). Human drug pollution in the aquatic system: the biochemical responses of *Danio rerio* adults. *Biology*, 10(10), 1064. <https://doi.org/10.3390/biology10101064>
- McLachlan, M. S., Holmström, K. E., Reth, M., & Berger, U. (2007). Riverine discharge of perfluorinated carboxylates from the European continent. *Environmental Science & Technology*, 41(21), 7260-7265. <https://doi.org/10.1021/es071471p>

- McNeish, R. E., Kim, L. H., Barrett, H. A., Mason, S. A., Kelly, J. J., & Hoellein, T. J. (2018). Microplastic in riverine fish is connected to species traits. *Scientific reports*, 8(1), 11639. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29980-9>
- Medihair, (2024). [Statistiche dell'industria della bellezza e dei cosmetici \(2024\) \(medihair.com\)](https://www.medihair.com/it/statistiche-dellindustria-della-bellezza-e-dei-cosmetici-2024)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.001>
- Mezzelani, M., & Regoli, F. (2022). The biological effects of pharmaceuticals in the marine environment. *Annual review of marine science*, 14(1), 105-128.
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d'Errico, G., Consolandi, G., Milan, M., ... & Regoli, F. (2018). Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, Ibuprofen and Ketoprofen: Insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes. *Chemosphere*, 198, 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.148>
- Miller, T. H., McEneff, G. L., Brown, R. J., Owen, S. F., Bury, N. R., & Barron, L. P. (2015). Pharmaceuticals in the freshwater invertebrate, *Gammarus pulex*, determined using pulverised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, 511, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.03>
- Mincarelli, L. F., Chapman, E. C., Rotchell, J. M., Turner, A. P., & Wollenberg Valero, K. C. (2023). Sex and gametogenesis stage are strong drivers of gene expression in *Mytilus edulis* exposed to environmentally relevant plasticiser levels and pH 7.7. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(9), 23437-23449. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23801-3>
- Mincarelli, L. F., Rotchell, J. M., Chapman, E. C., Turner, A. P., & Valero, K. C. W. (2021). Consequences of combined exposure to thermal stress and the plasticiser DEHP in *Mytilus spp.* differ by sex. *Marine pollution bulletin*, 170, 112624. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112624>
- Miranda, D. A., Benskin, J. P., Awad, R., Lepoint, G., Leonel, J., & Hatje, V. (2021). Bioaccumulation of Per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in a tropical estuarine food web. *Science of the Total Environment*, 754, 142146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142146>
- Mohr, S., Schröder, H., Feibicke, M., Berghahn, R., Arp, W., & Nicklisch, A. (2008). Long-term effects of the antifouling booster biocide Irgarol 1051 on periphyton, plankton and ecosystem function in freshwater pond mesocosms. *Aquatic Toxicology*, 90(2), 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.08.004>

- Møller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A., & Rao, R. S. P. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of proteomics*, 74(11), 2228-2242. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.004>.
- Moore, M. N., & Allen, J. I. (2002). A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Marine environmental research*, 54(3-5), 579-584. [https://doi.org/10.1016/s0141-1136\(02\)00166-6](https://doi.org/10.1016/s0141-1136(02)00166-6)
- Moore, M. N., & Lowe, D. M. (1977). The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *Journal of Invertebrate Pathology*, 29(1), 18-30. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(77\)90167-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(77)90167-7)
- 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. <https://doi.org/10.1080/17435390802593057>
- Mordor Intelligence Research & Advisory. (2023, November). Personal Care Industry Size & Share Analysis - Growth Trends & Forecasts (2024 - 2029). Mordor Intelligence. Retrieved April 17, 2024, from <https://www.mordorintelligence.it/industry-reports/global-beauty-and-personal-care-products-market-industry>
- Moreira, D. G., Aires, A., de Lourdes Pereira, M., & Oliveira, M. (2022). Levels and effects of antidepressant drugs to aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 256, 109322. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109322>
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Huerta, B., Barceló, D., & León, V. M. (2016). Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon?. *Environmental Research*, 146, 282-298. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.001>
- Morris, R. J., Lockwood, A. P. M., & Dawson, M. E. (1982). Changes in the fatty acid composition of the gill phospholipids in *Gammarus duebeni* with degree of gill contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 13(10), 345-348. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(82\)90037-6](https://doi.org/10.1016/0025-326X(82)90037-6)
- Morris, S. L., Walsh, R. C., & Hansen, J. N. (1984). Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *Journal of Biological Chemistry*, 259(21), 13590-13594. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)90734-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)90734-9)
- Moschet, C., Vermeirssen, E. L., Singer, H., Stamm, C., & Hollender, J. (2015). Evaluation of in-situ calibration of Chemcatcher passive samplers for 322 micropollutants in agricultural and urban affected rivers. *Water Research*, 71, 306-317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.043>.
- Mose, A. P., Frost, S., Öhlund, U., & Andersen, K. E. (2013). Allergic contact dermatitis from octylisothiazolinone. *Contact Dermatitis*, 69(1), 49-52. <https://doi.org/10.1111/cod.12068>

- Muir, D., & Miaz, L. T. (2021). Spatial and temporal trends of perfluoroalkyl substances in global ocean and coastal waters. *Environmental Science & Technology*, 55(14), 9527-9537. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c08035>
- Multisanti, C. R., Merola, C., Perugini, M., Aliko, V., & Faggio, C. (2022). Sentinel species selection for monitoring microplastic pollution: A review on one health approach. *Ecological Indicators*, 145, 109587. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109587>
- Multisanti, C. R., Riolo, K., Impellitteri, F., Chebbi, I., Faggio, C., & Giannetto, A. (2023). Short-term in vitro exposure of *Pinctada imbricata*'s haemocytes to quaternium-15: exploring physiological and cellular responses. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 101, 104198. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104198>
- 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. <https://doi.org/10.3390/antiox13060734>
- Munoz, G., Mercier, L., Duy, S. V., Liu, J., Sauvé, S., & Houde, M. (2022). Bioaccumulation and trophic magnification of emerging and legacy per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in a St. Lawrence River food web. *Environmental Pollution*, 309, 119739. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119739>
- Muñoz, M. A., & Lein, P. J. (2024). Toxic textiles: Potential health risks associated with toxic chemicals in clothing. *Open Access Government*, 41(1), 384-385. <https://doi.org/10.56367/oag-041-9857>
- Musee, N., Ngwenya, P., Motaung, L. K., Moshuhla, K., & Nomngongo, P. (2023). Occurrence, effects, and ecological risks of chemicals in sanitizers and disinfectants: A review. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 5, 62-78. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2023.01.003>
- 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, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1061-0>
- Nagarnaik, P., Batt, A., & Boulanger, B. (2010). Concentrations and mass loadings of cardiovascular pharmaceuticals in healthcare facility wastewaters. *Journal of environmental monitoring*, 12(11), 2112-2119. <https://doi.org/10.1039/C0EM00216J>
- Nagy, I. Z. (1977). Cytosomes (yellow pigment granules) of molluscs as cell organelles of anoxic energy production. In *International Review of Cytology* (Vol. 49, pp. 331-377). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61952-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61952-X)

- Nalecz-Jawecki, G., Hajnas, A., & Sawicki, J. (2008). Photodegradation and phototoxicity of thioridazine and chlorpromazine evaluated with chemical analysis and aquatic organisms. *Ecotoxicology*, 17, 13-20. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0171-z>
- Nam, Y. K., & Kim, E. J. (2017). Diversification and domain evolution of molluskan metallothioneins: a mini review. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 20, 1-18. <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0054-z>
- Namazkar, S., Ragnarsdottir, O., Josefsson, A., Branzell, F., Abel, S., Abdallah, M. A. E., ... & Benskin, J. P. (2024). Characterization and dermal bioaccessibility of residual-and listed PFAS ingredients in cosmetic products. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 26(2), 259-268. <https://doi.org/10.1039/D3EM00461A>
- Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine pollution bulletin*, 99(1-2), 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.029>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.093>
- Natalotto, A., Sureda, A., Maisano, M., Spanò, N., Mauceri, A., & Deudero, S. (2015). Biomarkers of environmental stress in gills of *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) from Balearic Island. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.035>
- National Center for Biotechnology Information, 2023. PubChem Compound Summary for CID 16212221, propachlor ESA. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/propachlor-ESA>.
- Navarra, M., Mannucci, C., Delbò, M., & Calapai, G. (2015). *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application. *Frontiers in pharmacology*, 6, 36. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00036>
- Nehring, A., Bury, D., Ringbeck, B., Kling, H. W., Otter, R., Weiss, T., ... & Koch, H. M. (2020). Metabolism and urinary excretion kinetics of di (2-ethylhexyl) adipate (DEHA) in four human volunteers after a single oral dose. *Toxicology Letters*, 321, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.12.006>
- Nekhavambe, T. J. (2008). *Determination and distribution of polyaromatic hydrocarbons in rivers, surface runoff and sediments in and around Thohoyandou, Limpopo Region* (Doctoral dissertation, MSc Thesis, University of Venda).
- Nelms, S. E., Barnett, J., Brownlow, A., Davison, N. J., Deaville, R., Galloway, T. S., ... & Godley, B. J. (2019). Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory?. *Scientific Reports*, 9(1), 1075. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37428-3>

Nelson, J. S. (1981). Pathology of vitamin E deficiency.

Nentwig, G., Oetken, M., & Oehlmann, J. (2004). Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates—the example of carbamazepine and clofibric acid. In *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks* (pp. 195-208). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-09259-0_16

Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A., & Ouddane, B. (2015). Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environmental Science & Technology*, 49(7), 4019-4035. <https://doi.org/10.1021/es505233b>

Nguyen, M. A., Wiberg, K., Ribeli, E., Josefsson, S., Futter, M., Gustavsson, J., & Ahrens, L. (2017). Spatial distribution and source tracing of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in surface water in Northern Europe. *Environmental Pollution*, 220, 1438-1446. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.089>

Nilsen, E. B., Rosenbauer, R. R., Furlong, E. T., Burkhardt, M. R., Werner, S. L., Greaser, L., & Noriega, M. (2007). Pharmaceuticals, personal care products and anthropogenic waste indicators detected in streambed sediments of the lower Columbia River and selected tributaries. *National Ground Water Association*, 4483, 15.

Nishimura, H. (1987). Role of the renin-angiotensin system in osmoregulation. In “Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications”(PKT Pang and MP Schreiber, Eds.) Vol. 2.

Nishimura, H. (2017). Renin-angiotensin system in vertebrates: phylogenetic view of structure and function. *Anatomical science international*, 92, 215-247. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0372-8>

Nishimura, H., & Sequeira-Lopez, M. L. S. (2021). Phylogeny and ontogeny of the renin-angiotensin system: Current view and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 254, 110879. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110879>

Notta, F., & James Koropatnick, D. (2006). Metallothioneins in drug resistance. *Cancer Drug Resistance*, 223-239. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-035-5_13

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. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.006>

NRC (National Research Council), 2008. Phthalates and cumulative risk assessment: The tasks ahead. Committee on the Health Risks of Phthalates. Prepublication Copy. The National Academies Press. Washington, D.C. 175 pp. Available at /www.nationalacademies.orgS

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., 2003. Chapter 17 mollusks as bioindicators. Trace Metals and other Contaminants in the Environment 7, 577–635. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80147-9](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9)

Ogunfowokan, A. O., Oyekunle, J. A. O., Torto, N., & Akanni, M. S. (2012). A study on persistent organochlorine pesticide residues in fish tissues and water from an agricultural fish pond. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(2), 165-185.

Ojemaye, C. Y., & Petrik, L. (2019). Pharmaceuticals in the marine environment: a review. *Environmental Reviews*, 27(2), 151-165. <https://doi.org/10.1139/er-2018-0054>

Ojemaye, C. Y., Onwordi, C. T., Pampanin, D. M., Sydnes, M. O., & Petrik, L. (2020). Presence and risk assessment of herbicides in the marine environment of Camps Bay (Cape Town, South Africa). *Science of The Total Environment*, 738, 140346. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140346>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.028>.

Olowoyo, J. O., & Mugivhisa, L. L. (2019). Evidence of uptake of different pollutants in plants harvested from soil treated and fertilized with organic materials as source of soil nutrients from developing countries. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0165-0>.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2021. Reconciling Terminology of the Universe of Per- and Polyfluoroalkyl Substances: Recommendations and Practical Guidance Series on Risk Management No.61. ENV/CBC/MONO(2021)25. [https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO\(2021\)25/En/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO(2021)25/En/pdf).

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Screening Information Data Set (SIDS). *Sodium Dodecyl Sulfate*. Available at: <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/151213.htm>. Accessed August 19, 2015.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), T.G.305, 2012. Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure Paris.

Ortúzar, M., Esterhuizen, M., Olicón-Hernández, D. R., González-López, J., & Aranda, E. (2022). Pharmaceutical pollution in aquatic environments: a concise review of environmental impacts and bioremediation systems. *Frontiers in microbiology*, 13, 869332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.869332>

Ostuzzi, G., Papola, D., Gastaldon, C., Schoretsanitis, G., Bertolini, F., Amaddeo, F., ... & Barbui, C. (2020). Safety of psychotropic medications in people with COVID-19: evidence review and practical recommendations. *BMC medicine*, 18, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01685-9>

- Owczarek, K., Kubica, P., Kudlak, B., Rutkowska, A., Konieczna, A., Rachoń, D., ... & Wasik, A. (2018). Determination of trace levels of eleven bisphenol A analogues in human blood serum by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Science of the total environment*, 628, 1362-1368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.148>.
- Owen, S. F., Huggett, D. B., Hutchinson, T. H., Hetheridge, M. J., Kinter, L. B., Ericson, J. F., & Sumpter, J. P. (2009). Uptake of propranolol, a cardiovascular pharmaceutical, from water into fish plasma and its effects on growth and organ biometry. *Aquatic Toxicology*, 93(4), 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.009>
- Oyekunle, J. A. O., Akindolani, O. A., Sosan, M. B., & Adekunle, A. S. (2017). Organochlorine pesticide residues in dried cocoa beans obtained from cocoa stores at Ondo and Ile-Ife, Southwestern Nigeria. *Toxicology reports*, 4, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.03.001>
- Packer, L., & Landvik, S. (1989). Vitamin E: introduction to biochemistry and health benefits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 570, 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb14903.x>
- 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. <https://doi.org/10.3390/molecules21020144>
- Pagano, M., Fabrello, J., Multisanti, C. R., Zicarelli, G., Ciscato, M., Boldrin, F., ... & Faggio, C. (2023). A first insight into haemocytes of *Pinctada imbricata radiata*: A morpho-functional characterization. *Microscopy Research and Technique*, 86(3), 368-377. <https://doi.org/10.1002/jemt.24278>
- 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. <https://doi.org/10.1007/S41742-017-0020-8>.
- Pagano, M., Savoca, S., Impellitteri, F., Albano, M., Capillo, G., & Faggio, C. (2022). Toxicological evaluation of acetylsalicylic acid in non-target organisms: chronic exposure on *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Frontiers in Physiology*, 13, 920952. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.920952>.
- Pagano, M., Stara, A., Aliko, V., & Faggio, C. (2020). Impact of neonicotinoids to aquatic invertebrates—in vitro studies on *Mytilus galloprovincialis*: A review. *Journal of marine science and engineering*, 8(10), 801. <https://doi.org/10.3390/jmse8100801>.
- Page, H. M., & Ricard, Y. O. (1990). Food availability as a limiting factor to mussel *Mytilus edulis* growth in California coastal waters. *Fishery Bulletin*, 88(4), 677-686.

- Paijens, C., Bressy, A., Frère, B., Tedoldi, D., Mailler, R., Rocher, V., ... & Moilleron, R. (2021). Urban pathways of biocides towards surface waters during dry and wet weathers: Assessment at the Paris conurbation scale. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123765. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123765>
- Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., ... & Devin, S. (2014). Towards a better understanding of biomarker response in field survey: a case study in eight populations of zebra mussels. *Aquatic toxicology*, 155, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.008>.
- Palazzolo, S., Caligiuri, I., Sfriso, A. A., Mauceri, M., Rotondo, R., Campagnol, D., ... & Rizzolio, F. (2022). Early warnings by liver organoids on short-and long-chain PFAS toxicity. *Toxics*, 10(2), 91. <https://doi.org/10.3390/toxics10020091>
- Paluselli, A., Fauvelle, V., Schmidt, N., Galgani, F., Net, S., Sempere, R., 2018. Distribution of phthalates in marseille bay (NW mediterranean sea). *Sci. Total Environ.* 621, 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.306>
- Pan, C. G., Zhao, J. L., Liu, Y. S., Zhang, Q. Q., Chen, Z. F., Lai, H. J., ... & Ying, G. G. (2014). Bioaccumulation and risk assessment of per-and polyfluoroalkyl substances in wild freshwater fish from rivers in the Pearl River Delta region, South China. *Ecotoxicology and environmental safety*, 107, 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.031>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108806>
- Parisi, M. G., Pirrera, J., La Corte, C., Dara, M., Parrinello, D., & Cammarata, M. (2021). Effects of organic mercury on *Mytilus galloprovincialis* haemocyte function and morphology. *Journal of Comparative Physiology B*, 191, 143-158. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01306-0>
- Parrott, J. L., & Balakrishnan, V. K. (2017). Life-cycle exposure of fathead minnows to environmentally relevant concentrations of the β -blocker drug propranolol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(6), 1644-1651. <https://doi.org/10.1002/etc.3703>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101841>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.110200>

Pereira, A. M., Silva, L. J., Meisel, L. M., Lino, C. M., & Pena, A. (2015). Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment. *Environmental research*, 136, 108-119. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.09.041>

Petrunyaka, V. V. (1982). Localization and role of carotenoids in molluscan neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2, 11-20. <https://doi.org/10.1007/BF00735063>

Pignotti, E., Casas, G., Llorca, M., Tellbüscher, A., Almeida, D., Dinelli, E., ... & Barceló, D. (2017). Seasonal variations in the occurrence of perfluoroalkyl substances in water, sediment and fish samples from Ebro Delta (Catalonia, Spain). *Science of the Total Environment*, 607, 933-943. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.025>

Ping, S., Lin, W., Ming, R., He, Y., Yin, Y., & Ren, Y. (2022). Toxic effects of four cardiovascular drugs on the development and epigenetics of zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 846, 157360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157360>

Pirard, C., Dufour, P., & Charlier, C. (2020). Background contamination of perfluoroalkyl substances in a Belgian general population. *Toxicology letters*, 333, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.015>

Piva, E., Schumann, S., Dotteschini, S., Brocca, G., Radaelli, G., Marion, A., ... & Santovito, G. (2022). Antioxidant responses induced by PFAS exposure in freshwater fish in the veneto region. *Antioxidants*, 11(6), 1115. <https://doi.org/10.3390/antiox11061115>

Plastic Technology, 2016. Health, Eco Concerns Give Non-phthalate Plasticizers a Push. <http://fww.ptonline.com/articles/health-environmental-concerns-give-non-phthalate-plasticizers-a-push>.

Porretti, M., Arrigo, F., Di Bella, G., & Faggio, C. (2022). Impact of pharmaceutical products on zebrafish: An effective tool to assess aquatic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 261, 109439. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109439>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139273>

PPDB (Pesticide Properties Data Base), 2023. Propachlor (Ref: CP 31393). <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/543.htm> (19/01/2023).

Pradhan, A., Olsson, P. E., & Jass, J. (2018). Di (2-ethylhexyl) phthalate and diethyl phthalate disrupt lipid metabolism, reduce fecundity and shortens lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, 190, 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.123>.

Proctor & Gamble (P&G). *Safety Data Sheets*. Available at: <http://www.pgproductsafety.com/productsafety>. Accessed August 19, 2015.

Pu, S. Y., Hamid, N., Ren, Y. W., & Pei, D. S. (2020). Effects of phthalate acid esters on zebrafish larvae: Development and skeletal morphogenesis. *Chemosphere*, 246, 125808. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125808>.

Pütz, K. W., Namazkar, S., Plassmann, M., & Benskin, J. P. (2022). Are cosmetics a significant source of PFAS in Europe? product inventories, chemical characterization and emission estimates. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 24(10), 1697-1707. <https://doi.org/10.1039/D2EM00123C>

Qian, L., Liu, J., Lin, Z., Chen, X., Yuan, L., Shen, G., ... & Li, Y. (2020). Evaluation of the spinal effects of phthalates in a zebrafish embryo assay. *Chemosphere*, 249, 126144. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126144>

Quiroga, J. M., Sales, D., & Gomez-Parra, A. (1989). Experimental evaluation of pollution potential of anionic surfactants in the marine environment. *Water Research*, 23(7), 801-807. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(89\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90002-X).

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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.040>

Rahman, M., & Brazel, C. S. (2004). The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Progress in polymer science*, 29(12), 1223-1248. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.10.001>

Ramesh, M., Priyanka, M., Tamilarasi, R., Poopal, R. K., Ren, Z., & Li, B. (2023). Short-term toxicity of chloroacetanilide herbicide on non-target organism: estimation of median-lethal concentration, hematological, biochemical, ion regulation, and antioxidants. *Comparative Clinical Pathology*, 32(1), 125-137. <https://doi.org/10.1007/s00580-022-03422-5>

Rapporto-OsMed, 2022. https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1967301/Rapporto-OsMed-2022_numeri.pdf

Rashid, B., Husnain, T., & Riazuddin, S. (2010). Herbicides and pesticides as potential pollutants: a global problem. *Plant adaptation and phytoremediation*, 427-447.

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. <https://doi.org/10.3390/vetsci10010053>

Rawa-Adkonis, M., Wolska, L., & Namieśnik, J. (2006). Analytical procedures for PAH and PCB determination in water samples—error sources. *Critical reviews in analytical chemistry*, 36(2), 63-72. <https://doi.org/10.1080/10408340600713645>

Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC

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

Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC (Text with EEA relevance)Text with EEA relevance

Regulation (EU) 2019/1021 of the European Parliament and of the Council of 20 June 2019 on persistent organic pollutants (recast). <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/1021/2023-06-10>

Regulation EC, 2008. No. 1272/2008 of the European parliament and of the council, on classification, labeling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing directives 67/548/eec and 1999/45/ec, and amending regulation (EC.) No. 1907/2006. In: Eur Union:L353.

Reichert, J. F., Souza, D. M., & Martins, A. F. (2019). Antipsychotic drugs in hospital wastewater and a preliminary risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 559-567. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.021>

Reinikainen, J., Bouhoulle, E., & Sorvari, J. (2024). Inconsistencies in the EU regulatory risk assessment of PFAS call for readjustment. *Environment International*, 108614. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108614>

Richardson, M. L., & Bowron, J. M. (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 37(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1985.tb04922.x>

Roberts, D. (1975). The effect of pesticides on byssus formation in the common mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* (1970), 8(4), 241-254. [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(75\)90080-4](https://doi.org/10.1016/0013-9327(75)90080-4)

Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive toxicology*, 42, 132-155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>

Rochman, C. M., Kurobe, T., Flores, I., & Teh, S. J. (2014). Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the total environment*, 493, 656-661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.051>.

Roden, K. (2010). Preservatives in personal care products. *Microbiology australia*, 31(4), 195-197. <https://doi.org/10.1071/MA10195>

Rodríguez-Carmona, Y., Ashrap, P., Calafat, A. M., Ye, X., Rosario, Z., Bedrosian, L. D., ... & Watkins, D. (2020). Determinants and characterization of exposure to phthalates, DEHTP and

DINCH among pregnant women in the PROTECT birth cohort in Puerto Rico. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 30(1), 56-69. <https://doi.org/10.1038/s41370-019-0168-8>

Rojo, M. G., Cristos, D., & Carriquiriborde, P. (2023). Bioconcentration of carbamazepine, enalapril, and sildenafil in neotropical fish species. *Frontiers in Toxicology*, 5, 1247453. <https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1247453>

Roma, J., Feijão, E., Vinagre, C., Duarte, B., & Matos, A. R. (2022). Impacts of dissolved Zn and nanoparticle forms in the fatty acid landscape of *Mytilus galloprovincialis*. *Science of The Total Environment*, 817, 152807. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152807>

Rosen SL. Fundamental principles of polymeric materials, 2nd ed. New York: Wiley; 1993.

Roth, K., Imran, Z., Liu, W., & Petriello, M. C. (2020). Diet as an exposure source and mediator of per-and polyfluoroalkyl substance (PFAS) toxicity. *Frontiers in toxicology*, 2, 601149. <https://doi.org/10.3389/ftox.2020.601149>

Rotondo, A., La Torre, G. L., Bartolomeo, G., Rando, R., Vadalà, R., Zimbaro, V., & Salvo, A. (2021). Profile of carotenoids and tocopherols for the characterization of lipophilic antioxidants in “ragusano” cheese. *Applied Sciences*, 11(16), 7711. <https://doi.org/10.3390/app11167711>.

Russo, M., Arigò, A., Calabrò, M. L., Farnetti, S., Mondello, L., & Dugo, P. (2016). Bergamot (*Citrus bergamia* Risso) as a source of nutraceuticals: limonoids and flavonoids. *Journal of Functional Foods*, 20, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.005>

Ruttkay-Nedecky, B., Nejd, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., ... & Kizek, R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 6044-6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>.

Saad, N., 2021. Phthalates and Non-phthalates Plasticizers Disrupt Lipid Metabolism.

Salerno, R., Casale, F., Calandruccio, C., & Procopio, A. (2016). Characterization of flavonoids in *Citrus bergamia* (Bergamot) polyphenolic fraction by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC/HRMS). *PharmaNutrition*, 4, S1-S7. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2015.10.001>

Salvo, A., La Torre, G. L., Rotondo, A., Mangano, V., Gervasi, T., Gervasi, C., ... & Dugo, G. (2020). Accumulation of PCBs, PAHs, plasticizers and inorganic elements in *Hexanchus griseus* from the strait of Messina (Central Mediterranean sea). *Natural product research*, 34(1), 172-176. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1601197>.

Salzet, M., Deloffre, L., Breton, C., Vieau, D., & Schoofs, L. (2001). The angiotensin system elements in invertebrates. *Brain research reviews*, 36(1), 35-45. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00063-7)

Sánchez-Muros, M. J., Villacreces, S., Miranda-de la Lama, G., de Haro, C., & García-Barroso, F. (2013). Effects of chemical and handling exposure on fatty acids, oxidative stress and

morphological welfare indicators in gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Fish physiology and biochemistry*, 39, 581-591. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9721-2>

Santos, L. H., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 175(1-3), 45-95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>

Sato, M., & Kondoh, M. (2002). Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 196(1), 9-22. <https://doi.org/10.1620/tjem.196.9>.

Savuca, A., Nicoara, M. N., & Faggio, C. (2022). Comprehensive review regarding the profile of the microplastic pollution in the coastal area of the Black Sea. *Sustainability*, 14(21), 14376. <https://doi.org/10.3390/su142114376>.

Sayed, A. E. D. H., & Authman, M. M. (2018). The protective role of *Spirulina platensis* to alleviate the Sodium dodecyl sulfate toxic effects in the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Ecotoxicology and environmental safety*, 163, 136-144. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.060>

SCCS. (2013). Opinion on benzisothiazolinone. Scientific Committee on Consumer Safety.

Scerra, G., Caporaso, M. G., Renna, M., & D'Agostino, M. (2021). Protocol for labeling and fixation of intact lysosomes with esterified amino acid analogs to assess lysosomal expansion in living eukaryotic cells. *STAR protocols*, 2(4), 100916. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100916>

Schmidt, N., Fauvelle, V., Castro-Jiménez, J., Lajaunie-Salla, K., Pinazo, C., Yohia, C., & Sempere, R. (2019). Occurrence of perfluoroalkyl substances in the Bay of Marseille (NW Mediterranean Sea) and the Rhône River. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110491. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110491>

Schnell, S., Bols, N. C., Barata, C., & Porte, C. (2009). Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. *Aquatic Toxicology*, 93(4), 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.007>

Schrank, I., Trotter, B., Dummert, J., Scholz-Böttcher, B. M., Löder, 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. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113233>

Schultes, L., Vestergren, R., Volkova, K., Westberg, E., Jacobson, T., & Benskin, J. P. (2018). Per- and polyfluoroalkyl substances and fluorine mass balance in cosmetic products from the Swedish market: implications for environmental emissions and human exposure. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20(12), 1680-1690. <https://doi.org/10.1039/C8EM00368H>

Schwensen, J. F., & Johansen, J. D. (2020). Isothiazolinones. *Kanerva's Occupational Dermatology*, 507-520. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68617-2_216

Sedha, S., Lee, H., Singh, S., Kumar, S., Jain, S., Ahmad, A., ... & Bajpai, V. K. (2021). Reproductive toxic potential of phthalate compounds–State of art review. *Pharmacological Research*, 167, 105536. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105536>.

Sekovski, I., Newton, A., & Dennison, W. C. (2012). Megacities in the coastal zone: Using a driver-pressure-state-impact-response framework to address complex environmental problems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 96, 48-59. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.07.011>

Seventh Generation (2015). *Material Safety Data Sheets*. Available at: <http://www.seventhgeneration.com/material-safety-data-sheets>. Accessed August 17, 2015.

Sharma, S. K., Tyagi, P. K., Upadhyay, A. K., Haque, M. A., Mohanty, S. S., Raghavendra, K., & Dash, A. P. (2009). Efficacy of permethrin treated long-lasting insecticidal nets on malaria transmission and observations on the perceived side effects, collateral benefits and human safety in a hyperendemic tribal area of Orissa, India. *Acta tropica*, 112(2), 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.022>

Sheir, S. K., & Handy, R. D. (2010). Tissue injury and cellular immune responses to cadmium chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: modulation by lipopolysaccharide. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 59, 602-613. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9502-9>

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. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120138>.

Shipley, S. R. (2014). The Effects of Sodium Lauryl Sulfate on the Abundance of Producers and Grazers in Aquatic Communities Using Freshwater Microcosms.

Shiry, N., Alavinia, S. J., Impellitteri, F., Alavinia, S. J., & Faggio, C. (2023a). Beyond the surface: Consequences of methyl tert-butyl ether (MTBE) exposure on oxidative stress, haematology, genotoxicity, and histopathology in rainbow trout. *Science of the Total Environment*, 900, 165784. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165784>

Shiry, N., Derakhshesh, N., Alavinia, S. J., Pouladi, M., Falco, F., & Faggio, C. (2023). *Anodonta cygnea*, a freshwater swan mussel, exposed to diazinon: toxicity thresholds in behaviour and physiology. *Veterinary Research Communications*, 47(3), 1303-1319. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10078-1>

Shoemaker, J. A. (2002). Novel chromatographic separation and carbon solid-phase extraction of acetanilide herbicide degradation products. *Journal of AOAC International*, 85(6), 1331-1337. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1331>

- SIGURGISLADOTTIR, S., ACKMAN, R. G., & O'KEEFE, S. F. (1993). SELECTIVE DEPOSITION OF α -TOCOPHEROL IN LIPIDS OF FARMED BLUE MUSSELS (*MYTILUS EDULIS*). *Journal of Food Lipids*, 1(2), 97-109. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.1993.tb00238.x>
- Silva, A. L., & Wright, S. H. (1994). Short-term cell volume regulation in *Mytilus californianus* gill. *Journal of experimental biology*, 194(1), 47-68. <https://doi.org/10.1242/jeb.194.1.47>.
- Silva, M. J., Wong, L. Y., Samandar, E., Preau Jr, J. L., Jia, L. T., & Calafat, A. M. (2019). Exposure to di-2-ethylhexyl terephthalate in the US general population from the 2015–2016 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environment international*, 123, 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.041>
- 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. <https://doi.org/10.3390/molecules25040991>
- Singer, H., Jaus, S., Hanke, I., Lück, A., Hollender, J., & Alder, A. C. (2010). Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. *Environmental pollution*, 158(10), 3054-3064. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.013>.
- Škrbić, B., Szyrwińska, K., Đurišić-Mladenović, N., Nowicki, P., & Lulek, J. (2010). Principal component analysis of indicator PCB profiles in breast milk from Poland. *Environment international*, 36(8), 862-872. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.04.008>
- Solé, M., Shaw, J. P., Frickers, P. E., Readman, J. W., & Hutchinson, T. H. (2010). Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396, 649-656. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3182-1>
- Solomon, K. R., Dalhoff, K., Volz, D., & Van Der Kraak, G. (2013). Effects of herbicides on fish. In *Fish physiology* (Vol. 33, pp. 369-409). academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398254-4.00007-8>
- Somwanshi, S. B., Dolas, R. T., Wagh, V. D., & Kotade, K. B. (2016). Pharmaceutically used plasticizers: a review. *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci*, 3, 277-285.
- Souaf, B., Methneni, N., Beltifa, A., Turco, V. L., Danioux, A., Litrenta, F., ... & Di Bella, G. (2023). Occurrence and seasonal variation of plasticizers in sediments and biota from the coast of Mahdia, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(16), 48532-48545. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25687-1>.
- Stamatis, N., Hela, D., & Konstantinou, I. (2010). Occurrence and removal of fungicides in municipal sewage treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3), 829-835. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.084>

- Stamper, D. M., & Tuovinen, O. H. (1998). Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor. *Critical Reviews in microbiology*, 24(1), 1-22. <https://doi.org/10.1080/10408419891294163>
- Stamper, D. M., Traina, S. J., & Tuovinen, O. H. (1997). *Anaerobic transformation of alachlor, propachlor, and metolachlor with sulfide* (Vol. 26, No. 2, pp. 488-494). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600020021x>
- Stara, A., Pagano, M., Albano, M., Savoca, S., Di Bella, G., Albergamo, A., ... & Faggio, C. (2021). Effects of long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to thiacloprid: A multibiomarker approach. *Environmental Pollution*, 289, 117892. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117892>
- Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandova, M., Albano, M., ... & Faggio, C. (2020a). Acute effects of neonicotinoid insecticides on *Mytilus galloprovincialis*: A case study with the active compound thiacloprid and the commercial formulation calypso 480 SC. *Ecotoxicology and environmental safety*, 203, 110980. <https://doi.org/10.1016/j.ECOENV.2020.110980>.
- Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandova, M., Vazzana, I., ... & Faggio, C. (2020b). Assessing the effects of neonicotinoid insecticide on the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the total environment*, 700, 134914. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134914>
- Statista. [Beauty tech market revenue worldwide 2021-2026 | Statista](#)
- 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. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.577678>
- Stock, F., Kochleus, C., Bansch-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. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.014>
- Stoiber, T., Evans, S., & Naidenko, O. V. (2020). Disposal of products and materials containing per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A cyclical problem. *Chemosphere*, 260, 127659. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127659>
- Sula, E., & Aliko, V. (2017). Effects of stressors on hematological and immunological response in the fresh water crucian carp fish, *Carassius carassius*. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 583-590.
- Sula, E., Aliko, V., Marku, E., Nuro, A., & Faggio, C. (2020). Evaluation of kidney histopathological alterations in Crucian Carp, *Carassius carassius*, from a pesticide and PCB-contaminated freshwater ecosystem, using light microscopy and organ index mathematical

model. *International journal of aquatic biology*, 8(3), 154-165. <https://ij-aquaticbiology.com/index.php/ijab/article/view/829>

Sule, R. O., Condon, L., & Gomes, A. V. (2022). A common feature of pesticides: oxidative stress—the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022(1), 5563759. <https://doi.org/10.1155/2022/5563759>

Sun, Q., Liu, Y., Teng, X., Luan, P., Teng, X., & Yin, X. (2022). Immunosuppression participated in complement activation-mediated inflammatory injury caused by 4-octylphenol via TLR7/IkBa/NF-κB pathway in common carp (*Cyprinus carpio*) gills. *Aquatic Toxicology*, 249, 106211. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106211>

Sureda, A., Box, A., Tejada, S., Blanco, A., Caixach, J., & Deudero, S. (2011). Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). *Aquatic Toxicology*, 101(3-4), 540-549. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.12.011>

Szychlinska, M. A., Calabrese, G., Ravalli, S., Parrinello, N. L., Forte, S., Castrogiovanni, P., ... & Musumeci, G. (2020). Cycloastragenol as an exogenous enhancer of chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. A morphological study. *Cells*, 9(2), 347. <https://doi.org/10.3390/cells9020347>.

Tamba, M., & O'Neill, P. (1991). Redox reactions of thiol free radicals with the antioxidants ascorbate and chlorpromazine: role in radioprotection. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (11), 1681-1685. <https://doi.org/10.1039/P29910001681>.

Tan, B., Xiong, J., Li, H., & You, J. (2020). Simultaneous analysis of current-use pesticides and their transformation products in water using mixture-sorbent solid phase extraction and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 43(12), 2409-2418. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000115>.

Tanoue, R., Nozaki, K., Nomiyama, K., Kunisue, T., & Tanabe, S. (2020). Rapid analysis of 65 pharmaceuticals and 7 personal care products in plasma and whole-body tissue samples of fish using acidic extraction, zirconia-coated silica cleanup, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1631, 461586. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461586>.

Taylor, M. D., Nilsson, S., Bräunig, J., Bowles, K. C., Cole, V., Moltschaniwskyj, N. A., & Mueller, J. F. (2019). Do conventional cooking methods alter concentrations of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in seafood?. *Food and chemical toxicology*, 127, 280-287. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.032>

Terman, A., Abrahamsson, N., & Brunk, U. T. (1999). Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show increased susceptibility to oxidative stress. *Experimental gerontology*, 34(6), 755-770. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(99\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(99)00045-5).

- Ternes, T. A., Bonerz, M., Herrmann, N., Teiser, B., & Andersen, H. R. (2007). Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: an option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere*, 66(5), 894-904. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.035>
- Teunen, L., Bervoets, L., Belpaire, C., De Jonge, M., & Groffen, T. (2021). PFAS accumulation in indigenous and translocated aquatic organisms from Belgium, with translation to human and ecological health risk. *Environmental Sciences Europe*, 33, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00477-z>
- Tittlemier, S. A., Pepper, K., Seymour, C., Moisey, J., Bronson, R., Cao, X. L., & Dabeka, R. W. (2007). Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(8), 3203-3210. <https://doi.org/10.1021/jf0634045>
- Tkachenko, H., & Grudniewska, J. (2016). Evaluation of oxidative stress markers in the heart and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum) exposed to the formalin. *Fish physiology and biochemistry*, 42, 1819-1832. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0260-0>
- Tornabene, B. J., Chislock, M. F., Gannon, M. E., Sepúlveda, M. S., & Hoverman, J. T. (2021). Relative acute toxicity of three per- and polyfluoroalkyl substances on nine species of larval amphibians. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 17(4), 684-690. <https://doi.org/10.1002/ieam.4391>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.017>.
- 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. <https://doi.org/10.1002/cbf.2925>.
- Torres-García, J. L., Ahuactzin-Pérez, M., Fernández, F. J., & Cortés-Espinosa, D. V. (2022). Bisphenol A in the environment and recent advances in biodegradation by fungi. *Chemosphere*, 303, 134940. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134940>.
- Tovell, P. W. A., Howes, D., & Newsome, C. S. (1975). Absorption, metabolism and excretion by goldfish of the anionic detergent sodium lauryl sulphate. *Toxicology*, 4(1), 17-29. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(75\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0300-483X(75)90018-9)
- Tramboo, S. M., Yousuf, A. R., & Akbar, S. (2011). Oxidative stress-inducing potential of butachlor in a freshwater fish, *Cyprinus carpio* (L). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(2), 285-295. <https://doi.org/10.1080/02772248.2010.515413>

Trautwein, C., & Kümmerer, K. (2012). Degradation of the tricyclic antipsychotic drug chlorpromazine under environmental conditions, identification of its main aquatic biotic and abiotic transformation products by LC–MSn and their effects on environmental bacteria. *Journal of Chromatography B*, 889, 24-38. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.022>.

Třešňáková, N., Çağlan Günal, A., Başaran Kankılıç, G., Paçal, E., Nihan Tavşanoğlu, Ü., Uyar, R., & Erkoç, F. (2020). Sub-lethal toxicities of zinc pyriithione, copper pyriithione alone and in combination to the indicator mussel species *Unio crassus* Philipsson, 1788 (Bivalvia, Unionidae). *Chemistry and Ecology*, 36(4), 292-308. <https://doi.org/10.1080/02757540.2020.1735377>

Tresnakova, N., Famulari, S., Zicarelli, G., Impellitteri, F., Pagano, M., Presti, G., ... & 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160874>

Tresnakova, N., Impellitteri, F., Famulari, S., Porretti, M., Filice, M., Caferro, A., ... & Faggio, C. (2023). Fitness assessment of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 after exposure to herbicide metabolite propachlor ESA. *Environmental Pollution*, 331, 121878. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121878>

Tresnakova, N., Kubec, J., Stara, A., Zuskova, E., Faggio, C., Kouba, A., & Velisek, J. (2022). Chronic toxicity of primary metabolites of chloroacetamide and glyphosate to early life stages of marbled crayfish *Procambarus virginalis*. *Biology*, 11(6), 927. <https://doi.org/10.3390/biology11060927>

Tresnakova, N., Stara, A., & Velisek, J. (2021). Effects of glyphosate and its metabolite AMPA on aquatic organisms. *Applied Sciences*, 11(19), 9004. <https://doi.org/10.3390/app11199004>

Trombini, C., Kazakova, J., Villar-Navarro, M., Hampel, M., Fernández-Torres, R., Bello-López, M. Á., & Blasco, J. (2022). Bioaccumulation and biochemical responses in the peppery furrow shell *Scrobicularia plana* exposed to a pharmaceutical cocktail at sub-lethal concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 242, 113845. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113845>

Tu, W., Niu, L., Liu, W., & Xu, C. (2013). Embryonic exposure to butachlor in zebrafish (*Danio rerio*): endocrine disruption, developmental toxicity and immunotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.031>

Tulcan, R. X. S., Ouyang, W., Gu, X., Lin, C., Tysklind, M., & Wang, B. (2021). Typical herbicide residues, trophic transfer, bioconcentration, and health risk of marine organisms. *Environment International*, 152, 106500. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106500>

U.S. Environmental Protection Agency, 1998. EPA R.E.D. Facts. Propachlor. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-019101_1-Nov-98.pdf (09/01/2023).

U.S. Environmental Protection Agency, 2023. Comptox Chemicals Dashboard. 2-[(1-Methylethyl)phenylamino]-2-Oxoethanesulfonic Acid. <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID20891452> (09/01/2023).

UNEP, (2009). Listing of Perfluorooctane Sulfonic Acid, Its Salts and Perfluorooctane Sulfonyl Fluoride. In *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. Geneva, Switzerland: UNEP.

UNEP. (2019). Listing of perfluorooctanoic acid (PFOA), its salts and PFOA-related compounds (UNEP/POPS/COP. 9/SC-9/12). In *Proceedings of the Ninth Meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. Geneva, Switzerland: UNEP.

Union, European, 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the council of 12 august 2013 amending directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Off J Eur Un L226, 1–17.

UNION, P. (2009). Regulation (EC) No 1223/2009 of the european parliament and of the council. *Official Journal of the European Union L*, 342, 59.

United Nations Economic Commission for Europe (UNECE), The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), (2004).

United Nations Environment Programme (UNEP), 2015. Plastic Cosmetics: Are We Polluting the Environment Through our Personal Care? <http://unep.org/gpa/documents/publications/PlasticinCosmetics2015Factsheet.pdf>.

United States Environmental Protection Agency. 2005. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Benzisothiazoline-3-one. OPP-2005–0200, EPA, Washington, D.C.

Ural, M. Ş., & Sağlam, N. (2005). A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 83(2-3), 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.04.004>

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, 96-105. <https://doi.org/10.1134/S1063074006020040>

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. <https://doi.org/10.1111/cod.14170>

Valdés, M. E., Amé, M. V., de los Angeles Bistoni, M., & Wunderlin, D. A. (2014). Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Science of the total environment*, 472, 389-396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.124>

- Valsecchi, S., Babut, M., Mazzoni, M., Pascariello, S., Ferrario, C., De Felice, B., ... & Polesello, S. (2021). Per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in fish from European lakes: Current contamination status, sources, and perspectives for monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(3), 658-676. <https://doi.org/10.1002/etc.4815>
- Van Doorslaer, X., Dewulf, J., Van Langenhove, H., & Demeestere, K. (2014). Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants. *Science of the Total Environment*, 500, 250-269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.075>
- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J., & Schoenfelder, G. (2012). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Ciencia & saude coletiva*, 17, 407-434. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>.
- Vazquez-Roig, P., Segarra, R., Blasco, C., Andreu, V., & Picó, Y. (2010). Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2471-2483. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.033>
- Velisek, J., Stara, A., Kubec, J., Zuskova, E., Buric, M., & Kouba, A. (2020). Effects of metazachlor and its major metabolite metazachlor OA on early life stages of marbled crayfish. *Scientific Reports*, 10(1), 875. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57740-1>.
- Vergani, L., Grattarola, M., Borghi, C., Dondero, F., & Viarengo, A. (2005). Fish and molluscan metallothioneins: a structural and functional comparison. *The FEBS journal*, 272(23), 6014-6023. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04993.x>
- Vermeirssen, E. L., Campiche, S., Dietschweiler, C., Werner, I., & Burkhardt, M. (2018). Ecotoxicological assessment of immersion samples from façade render containing free or encapsulated biocides. *Environmental toxicology and chemistry*, 37(8), 2246-2256. <https://doi.org/10.1002/etc.4176>.
- Vershinin, A. (1996). Carotenoids in mollusca: approaching the functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 113(1), 63-71. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(96\)00104-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(96)00104-6)
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., & Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine environmental research*, 44(1), 69-84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)
- Vieira, A. J., Beserra, F. P., Souza, M. C., Totti, B. M., & Rozza, A. L. (2018). Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*, 283, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007>

Vieno, N., Hallgren, P., Wallberg, P., Pyhälä, M., Zandaryaa, S., & Baltic Marine Environment Protection Commission. (2017). *Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region: a status report* (Vol. 1). Unesco Publishing.

Villalba, A., Carballal, M.J., L´opez, C., 2001. Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.* 46 (3), 213–216. <https://doi.org/10.3354/dao046213>.

Vo, H. C., & Pham, M. H. (2021). Ecotoxicological effects of microplastics on aquatic organisms: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 44716–44725. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14982-4>.

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. <https://doi.org/10.1021/es302332w>

Wadige, C. P. M., Taylor, A. M., Maher, W. A., Ubrihien, R. P., & Krikowa, F. (2014). Effects of lead-spiked sediments on freshwater bivalve, *Hyridella australis*: linking organism metal exposure-dose-response. *Aquatic Toxicology*, 149, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.017>

Wan, H. T., Leung, P. Y., Zhao, Y. G., Wei, X., Wong, M. H., & Wong, C. K. (2013). Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations. *Journal of hazardous materials*, 261, 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.034>

Wang, F., Wong, C. S., Chen, D., Lu, X., Wang, F., & Zeng, E. Y. (2018). Interaction of toxic chemicals with microplastics: a critical review. *Water research*, 139, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.003>

Wang, J., & Gardinali, P. R. (2012). Analysis of selected pharmaceuticals in fish and the fresh water bodies directly affected by reclaimed water using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404, 2711–2720. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6139-8>

Wang, Q., Yang, H., Yang, M., Yu, Y., Yan, M., Zhou, L., ... & Li, Y. (2019). Toxic effects of bisphenol A on goldfish gonad development and the possible pathway of BPA disturbance in female and male fish reproduction. *Chemosphere*, 221, 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.033>

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. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.011>

Wang, W., & Wang, J. (2018). Different partition of polycyclic aromatic hydrocarbon on environmental particulates in freshwater: microplastics in comparison to natural

sediment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 648-655.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.029>

Wang, Y. S., Liu, J. C., Chen, W. C., & Yen, J. H. (2008). Characterization of acetanilide herbicides degrading bacteria isolated from tea garden soil. *Microbial ecology*, 55, 435-443.
<https://doi.org/10.1007/s00248-007-9289-z>.

Wang, Y., Kim, J., Huang, C. H., Hawkins, G. L., Li, K., Chen, Y., & Huang, Q. (2022). Occurrence of per-and polyfluoroalkyl substances in water: a review. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 8(6), 1136-1151. <https://doi.org/10.1039/D1EW00851J>

Wang, Z., Walker, G. W., Muir, D. C., & Nagatani-Yoshida, K. (2020). Toward a global understanding of chemical pollution: a first comprehensive analysis of national and regional chemical inventories. *Environmental science & technology*, 54(5), 2575-2584.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06379>

Waykar, B., & Deshmukh, G. (2012). Evaluation of bivalves as bioindicators of metal pollution in freshwater. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88, 48-53.
<https://doi.org/10.1007/S00128-011-0447-0>

Wei, R., Zhang, W., Pu, C., Shao, Q., Xu, Q., Li, P., ... & Weng, D. (2023). Assessment of lipid metabolism-disrupting effects of non-phthalate plasticizer diisobutyl adipate through in silico and in vitro approaches. *Environmental Toxicology*, 38(6), 1395-1404.
<https://doi.org/10.1002/tox.23773>.

Whelan, J., Gouffon, J., & Zhao, Y. (2012). Effects of dietary stearidonic acid on biomarkers of lipid Metabolism4. *The Journal of nutrition*, 142(3), 630S-634S.
<https://doi.org/10.3945/jn.111.149138>

Whitehead, H. D., Venier, M., Wu, Y., Eastman, E., Urbanik, S., Diamond, M. L., ... & Peaslee, G. F. (2021). Fluorinated compounds in North American cosmetics. *Environmental Science & Technology Letters*, 8(7), 538-544. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.1c00240>

WHO and IPCS (World Health Organization and International Programme on Chemical Safety), 1993. Propachlor. World Health Organization. 72 Pp. Wwww. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37024>.

Whyte, S., Sherden, A., 2016. Coles, Woolworths Pledge to Remove Products Containing Plastic Microbeads. ABC News,. <http://www.abc.net.au/news/2016-01-07/coleswoolworths-support-ban-on-microbeads-in-australia/7073674>

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.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.079>.

Widdows, J. (1992). Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physical aspects. *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*, 383-424.

Wieck, S., Olsson, O., & Kümmerer, K. (2018). Not only biocidal products: Washing and cleaning agents and personal care products can act as further sources of biocidal active substances in wastewater. *Environment international*, 115, 247-256. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.040>

Wittassek, M., & Angerer, J. (2008). Phthalates: metabolism and exposure. *International journal of andrology*, 31(2), 131-138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00837.x>.

Wittmer, I. K., Bader, H. P., Scheidegger, R., Singer, H., Lück, A., Hanke, I., ... & Stamm, C. (2010). Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. *Water research*, 44(9), 2850-2862. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.01.030>

World Health Organization, International programme on chemical safety (WHO/ IPCS), Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Environmental Health Criteria, 1998, p. 202.

Wronski, A. R., & Brooks, B. W. (2023). Global occurrence and aquatic hazards of antipsychotics in sewage influents, effluent discharges and surface waters. *Environmental Pollution*, 320, 121042. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121042>.

Xian, Y. P., Luo, H. Y., Guo, X. D., Wu, Y. L., Chen, Y. G., & Luo, D. H. (2013, February). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cosmetic samples by freezing lipid filtration-liquid-liquid distribution cleanup and gas chromatography-mass spectrometry. In *Analytical Abstracts* (Vol. 32, No. 1, pp. 85-89).

Xie, Z., Ebinghaus, R., Temme, C., Caba, A., & Ruck, W. (2005). Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of phthalates in the North Sea (German Bight). *Atmospheric Environment*, 39(18), 3209-3219. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.02.021>.

Xie, Z., Ebinghaus, R., Temme, C., Lohmann, R., Caba, A., & Ruck, W. (2007). Occurrence and air-sea exchange of phthalates in the Arctic. *Environmental science & technology*, 41(13), 4555-4560. <https://doi.org/10.1021/es0630240>.

Xu, B., Xu, Z. F., Deng, Y., & Yang, J. H. (2010). Protective effects of Chlorpromazine and Verapamil against cadmium-induced kidney damage in vivo. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(1), 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.12.009>.

Xu, C., Sun, X., Niu, L., Yang, W., Tu, W., Lu, L., ... & Liu, W. (2019). Enantioselective thyroid disruption in zebrafish embryo-larvae via exposure to environmental concentrations of the chloroacetamide herbicide acetochlor. *Science of The Total Environment*, 653, 1140-1148. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.037>.

Xu, H. E., Cao, W., Sun, H., Zhang, S., Li, P., Jiang, S., & Zhong, C. (2021). Dose-dependent effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Frontiers in Marine Science*, 8, 658361. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.658361>.

- Xue, Z., Zhang, Y., Tao, J., Kang, Y., Chen, Z., & Xue, Y. (2016). Theoretical elucidation of the metabolic mechanisms of phenothiazine neuroleptic chlorpromazine catalyzed by cytochrome P450 isoenzyme 1A2. *Theoretical Chemistry Accounts*, 135, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00214-016-1943-4>
- Yağci, M. A., Alp, A., Yağci, A., & Uysal, R. (2014). Diet and prey selection of pikeperch (*Sander lucioperca* Linnaeus, 1758) population in Lake Eğirdir (Turkey). *Archives of Biological Sciences*, 66(4), 1515-1527. <https://doi.org/10.2298/ABS1404515Y>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117597>
- Yang, J. L., Li, Y. F., Bao, W. Y., Satuito, C. G., & Kitamura, H. (2011). Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 in response to neurotransmitter blockers and tetraethylammonium. *Biofouling*, 27(2), 193-199. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.553717>
- Yang, M., Ryu, J. H., Jeon, R., Kang, D., & Yoo, K. Y. (2009). Effects of bisphenol A on breast cancer and its risk factors. *Archives of toxicology*, 83, 281-285. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0364-0>
- Yeung, L. W., Dassuncao, C., Mabury, S., Sunderland, E. M., Zhang, X., & Lohmann, R. (2017). Vertical profiles, sources, and transport of PFASs in the Arctic Ocean. *Environmental science & technology*, 51(12), 6735-6744. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00788>
- Yi, X., Ding, H., Lu, Y., Liu, H., Zhang, M., & Jiang, W. (2007). Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 68(8), 1576-1581. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.035>
- Yılmaz, S., Kılıç, N., Kaya, Ş., & Taşçı, G. (2023). A potential biomarker for predicting schizophrenia: metallothionein-1. *Biomedicines*, 11(2), 590. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020590>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.089>
- Zanette, J., Jenny, M. J., Goldstone, J. V., Parente, T., Woodin, B. R., Bainy, A. C., & Stegeman, J. J. (2013). Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. *Aquatic toxicology*, 128, 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.017>

- Zeng, Z., Song, B., Xiao, R., Zeng, G., Gong, J., Chen, M., ... & Yi, H. (2019). Assessing the human health risks of perfluorooctane sulfonate by in vivo and in vitro studies. *Environment international*, 126, 598-610. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.002>
- Zhang, J., Yang, L., Wei, L., Du, X., Zhou, L., Jiang, L., ... & Yang, H. (2012). Environmental impact of two organic amendments on sorption and mobility of propachlor in soils. *Journal of Soils and Sediments*, 12, 1380-1388. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0561-6>
- Zhang, K., Zhao, Y., & Fent, K. (2020). Cardiovascular drugs and lipid regulating agents in surface waters at global scale: Occurrence, ecotoxicity and risk assessment. *Science of The Total Environment*, 729, 138770. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138770>
- Zhang, L., Wu, P., Zhang, Y., Jin, Q., Yang, D., Wang, L., & Zhang, J. (2014). A GC/MS method for the simultaneous determination and quantification of chlorpromazine and diazepam in pork samples. *Analytical methods*, 6(2), 503-508. <https://doi.org/10.1039/c3ay41130c>
- Zhao, C., Teng, X., Yue, W., Suo, A., Zhou, W., & Ding, D. (2023). The effect of acute toxicity from tributyltin on *Liza haematocheila* liver: Energy metabolic disturbance, oxidative stress, and apoptosis. *Aquatic Toxicology*, 258, 106506. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106506>
- Zheng, W., Yates, S. R., Papiernik, S. K., & Guo, M. (2004). Transformation of herbicide propachlor by an agrochemical thiourea. *Environmental science & technology*, 38(24), 6855-6860. <https://doi.org/10.1021/es049384>
- Zhou, Q., Cui, J., Liu, Y., Gu, L., Teng, X., & Tang, Y. (2023). EGCG alleviated Mn exposure-caused carp kidney damage via trpm2-NLRP3-TNF- α -JNK pathway: Oxidative stress, inflammation, and tight junction dysfunction. *Fish & shellfish immunology*, 134, 108582. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108582>
- Zhukova, N. V. (1991). The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Comparative Biochemistry*, 100(4), 801-804. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90293-M](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90293-M)
- Zicarelli, G., Multisanti, C. R., Falco, F., & Faggio, C. (2022). Evaluation of toxicity of Personal Care Products (PCPs) in freshwaters: Zebrafish as a model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 94, 103923. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103923>.
- Zicarelli, G., Romano, C., Gallo, S., Valentino, C., Pepe Bellomo, V., Leonetti, F. L., ... & Sperone, E. (2023). Diet and plastic ingestion in the blackmouth catshark *Galeus melastomus*, Rafinesque 1810, in Italian waters. *Animals*, 13(6), 1039. <https://doi.org/10.3390/ani13061039>
- Zorita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Cancio, I., Soto, M., ... & Cajaraville, M. P. (2007). Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environmental pollution*, 148(1), 236-250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.022>

Zuccato, E., Castiglioni, S., & Fanelli, R. (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 122(3), 205-209. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.001>

Zyśk, M., Gapys, B., Ronowska, A., Gul-Hinc, S., Erlandsson, A., Iwanicki, A., ... & Bielarczyk, H. (2018). Protective effects of voltage-gated calcium channel antagonists against zinc toxicity in SN56 neuroblastoma cholinergic cells. *PLoS One*, 13(12), e0209363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209363>.



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del Progetto Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005) risorse FSE REACT-EU, Azione IV.4 “Dottorati e contratti di ricerca su tematiche dell’innovazione” e Azione IV.5 “Dottorati su tematiche Green”