



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

BIOLOGIA MARINA

**IMPATTO DELLE CREME SOLARI SU DIVERSI ORGANISMI MARINI
DEL MEDITERRANEO**

**IMPACT OF SUNSCREENS ON SEVERAL MEDITERRANEAN
MARINE ORGANISMS**

Candidata:

Giorgia Zenoni

Relatore

Prof.ssa Cinzia Corinaldesi

Correlatore:

Dott.ssa Francesca Marcellini

Sessione estiva

Anno Accademico 2022/2023

SOMMARIO

1 INTRODUZIONE

1.1 Impatti antropici sugli ecosistemi del Mar Mediterraneo

1.2 Creme solari nell'ecosistema marino costiero ed effetti sugli organismi

2 OBIETTIVI

3 MATERIALI E METODI

3.1 I Prodotti solari

*3.2 Impatto delle creme solari su *Nannochloropsis salina**

*3.3 Impatto delle creme solari su naupli di *Artemia salina**

*3.4 Impatto delle creme solari sullo sviluppo embrionale di *Paracentrotus lividus**

4 4. RISULTATI

*4.1. Effetti delle creme solari su *Nannochloropsis salina**

*4.2. Effetti delle creme solari su naupli di *A. salina**

*4.2. Effetti delle creme solari sullo sviluppo embrionale di *P. lividus**

5 DISCUSSIONI

6 CONCLUSIONI

7 BIBLIOGRAFIA

8 SITOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

1.1.: Impatti antropici sugli ecosistemi del Mar Mediterraneo

Il Mar Mediterraneo è uno dei bacini più importanti per la sua ricchezza di biodiversità (Piroddi et al., 2020). È stato stimato che il Mediterraneo ospita circa 17.000 specie, molte delle quali endemiche, quasi l'8% della biodiversità marina globale, a fronte di una superficie inferiore all'1% di tutti gli oceani (Coll et al., 2010).

Questo mare è caratterizzato da strette piattaforme continentali e una vasta area di mare aperto con alcune caratteristiche peculiari: (1) alta omotermia da 300 a 500 m fino al fondo, dove le temperature variano da 12.8°C a 13.5°C nel bacino occidentale e da 13.5°C a 15.5°C nella parte orientale e (2) elevata salinità di 37.5–39.5. A differenza dell'Oceano Atlantico, dove la temperatura diminuisce con la profondità, non ci sono rilevanti gradienti termici nelle profondità marine del Mediterraneo (Emig & Geistdoerfer, 2005). E' inoltre un bacino definito di evaporazione: l'evaporazione è maggiore rispetto all'apporto di acqua principalmente da parte dei fiumi. La temperatura media annuale della superficie marina mostra un'elevata stagionalità e importanti gradienti da ovest a est e da nord a sud (Coll et al., 2010).

La sua diversità biologica è dovuta principalmente all'adattamento di molte specie alle caratteristiche fisiche e climatiche del bacino e conferisce al Mar Mediterraneo una straordinaria capacità di produrre beni e servizi ecosistemici (i.e., regolazione del clima, produzione di ossigeno e sequestro del carbonio, fonte di materie prime e nutrimento, mitigazione dei cambiamenti climatici; Bethoux et al., 2005).

Inoltre, il Mar Mediterraneo rappresenta un'area chiave per lo studio degli effetti dei cambiamenti naturali e antropici sulla biodiversità e le sue conseguenze sul funzionamento degli ecosistemi (Danovaro & Pusceddo, 2007; Costello et al., 2006). (Coll et al., 2010).

Distruzione di habitat, pesca eccessiva, contaminanti, eutrofizzazione, introduzione di specie aliene e cambiamenti climatici stanno producendo effetti negativi sempre più evidenti sulla biodiversità e funzionamento degli ecosistemi del Mediterraneo.

Le foreste di macroalghe ad esempio, sono uno degli habitat più preziosi del Mar Mediterraneo, ma in rapida scomparsa (Tamburello et al., 2022). Si stima che circa l'80% sia andato perduto rispetto agli ultimi venti anni (Tamburello et al., 2019; Agnetta et al., 2015; Schiaparelli et al., 2007; Benedetti-Cecchi et al., 2001). In alcune aree del Golfo di Napoli infatti, la perdita delle popolazioni di macroalghe quali *Cystoseira sp.* è stata stimata tra il 60% e 100% (Grech, 2017). Anche il coralligeno, che rappresenta uno dei più importanti "hot spot" di biodiversità e uno dei principali ecosistemi marini per distribuzione, biomassa e ruolo svolto nel ciclo dei carbonati, è tra gli habitat più sensibili e vulnerabili alle alterazioni ambientali, sia su scala locale sia globale (Gennaro et al., 2020). Similmente, le praterie di *Posidonia oceanica*, importanti *hot spot* di biodiversità sono a rischio: il 30% è stato perso (Marbà et al., 2014) e si stima che il 70% di questi habitat andrà perso entro il 2050 (Bindoff et al., 2019; UNEP, IPCC, 2019).

La ricchezza culturale e la bellezza unica delle zone costiere hanno reso il Mar Mediterraneo la meta preferita di molti turisti europei e stranieri, infatti, già nel 2017, attirava oltre 267 milioni di turisti (Tovar-Sánchez et al., 2020; Caloni et al., 2021), la maggior parte dei quali concentrata nella stagione estiva (Tovar-Sánchez et al., 2019). Nonostante il vantaggio economico per il territorio, questo alto numero di vacanzieri provoca un'elevata pressione sull'ambiente, tra cui inquinamento, distruzione di habitat, sfruttamento delle risorse idriche e uso massivo di creme solari (a causa della maggiore consapevolezza dei rischi dovuti all'esposizione alle radiazioni ultraviolette-UV) che porta inevitabilmente al loro rilascio nell'ambiente costituendo una seria minaccia per gli organismi marini (Sureda et al., 2018). Queste sostanze sono state recentemente identificate come inquinanti emergenti (Tovar-Sánchez et al., 2019; Tsui et al., 2014) ovvero composti solitamente ritenuti marginali nell'analisi ambientale di routine, ma che stanno acquisendo maggior interesse da parte della comunità scientifica (Paredes et al., 2014) a causa del loro potenziale rischio ecologico negli ambienti acquatici (Fagervold et al., 2019).

1.2 Creme solari ed effetti sugli organismi marini

Nel 2018 è stato approvato un disegno di legge da parte della legislatura hawaiana (*Hawaii House of Representatives Bill HB600 HD1 2017*) che prevedeva il divieto di vendita e distribuzione di creme solari o prodotti per la cura personale (*Personale Care Cosmetics-PCPs*) contenenti filtri UV organici definiti tossici per la vita acquatica

quali ossibenzone e ottinoxato, nel tentativo di ridurre al minimo l'esposizione di queste sostanze negli habitat marini costieri delle Hawaii (Barone et al., 2019). Il divieto è in vigore dal 1° gennaio 2021 (Raffa et al., 2019), ma divieti simili si sono diffusi anche in altre aree del mondo in cui sono presenti scogliere coralline.

In Europa, i rischi ecotossicologici per gli ambienti acquatici, dovuti all'uso di creme solari e più in generale di sostanze chimiche presenti nei prodotti ad uso commerciale, sono valutati considerando delle condizioni standard di laboratorio definite dalla Direttiva REACH (registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche) (Fastelli & Renzi, 2019). Entrata in vigore a maggio 2018 la REACH si occupa di valutare i rischi tossicologici di qualsiasi prodotto chimico realizzato e commercializzato nella Comunità Europea in quantità maggiori ad 1 tonnellata/anno con lo scopo di considerarne i rischi per la salute umana ed ambientale (Report annuale Comunità Europea, 2006; Brock et al., 2006; Sobek et al., 2013). L'interesse scientifico e, di conseguenza, dell'opinione pubblica in questi anni si è principalmente focalizzato su ingredienti attivi contenuti nelle formulazioni solari, ossia i filtri UV classificati come organici (chimici) e inorganici (fisici) (Bilal et al., 2020).

Attualmente l'Unione Europea (Regolamento n. 1223/2009 della Commissione Europea) consente l'uso di 27 filtri UV in concentrazioni comprese tra il 2 % e il 15 % (Cadena-Aizaga et al., 2020). Negli Stati Uniti invece, i prodotti per la protezione solare sono classificati come prodotti da banco (OTC) e sono rigorosamente

regolamentati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) statunitense in base ai requisiti farmaceutici. Pertanto, attualmente sono consentiti solo 16 filtri UV (Miller et al., 2021). Anche la direttiva ASEAN, che regola il mercato dei cosmetici nel Sud-Est Asiatico, ricalca la Direttiva cosmesi Europea (DC) UE 76/768/CEE ed elenca i filtri UV consentiti (Ahmed, 2008).

Negli ultimi anni molti studi scientifici si sono concentrati sul potenziale impatto dei prodotti solari e delle loro componenti chimiche sull'ecosistema marino (Scheele et al., 2023; Watkins & Sallach, 2021; Corinaldesi et al., 2018; Hazeem et al., 2015; Maipas & Nicolopoulou-Stamati, 2015; Downs et al., 2015; Sánchez-Quiles et al., 2014; Fent et al., 2014; Picot Groz et al., 2014; Kim et al., 2011; Kim et al., 2011a).

È stato dimostrato che i prodotti solari promuovono il ciclo litico nel batterioplancton marino (Danovaro & Corinaldesi, 2003) e possono influenzare le prime fasi di sviluppo del riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Corinaldesi et al., 2017). Inoltre, studi recenti hanno evidenziato che i prodotti solari e i loro ingredienti causano lo sbiancamento dei coralli promuovendo infezioni virali (Corinaldesi et al., 2018; Danovaro et al., 2008) ed hanno effetti negativi sullo sviluppo delle planule dei coralli (Downs et al., 2016) e altri organismi marini tropicali (Corinaldesi et al., 2017; McCoshum et al., 2016).

I prodotti solari raggiungono l'ambiente marino attraverso il rilascio diretto durante le attività acquatiche ricreative, considerate peraltro la sorgente principale (Sánchez-Quiles et al., 2020), ma anche attraverso il rilascio indiretto dagli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue (Giokas et al., 2007). Nelle acque reflue

(WWTP) la rimozione dei prodotti contenuti nelle creme è spesso solo parziale, nonostante alcuni di essi siano in grado di degradarsi naturalmente nell'ambiente (Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2015; Díaz-Cruz & Barceló, 2009; Giokas et al., 2007).

I filtri UV organici, contenuti nelle creme solari sono tipicamente considerati composti pseudo-persistenti (Tsui et al., 2015) in quanto sono in grado di permanere nell'ambiente marino per decenni (Watkins & Sallach, 2021; Maipas & Nicolopoulou-Stamati, 2015). Molti dei composti chimici utilizzati nelle formulazioni solari sono stati ritrovati in differenti comparti ambientali quali colonna d'acqua, sedimento e matrici biologiche nell'ecosistema marino costiero, incluse le scogliere coralline, laghi e fiumi ed impianti di trattamento delle acque (Beltrán et al., 2021; Downs et al., 2015; Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2015; Paredes et al., 2014). Alte concentrazioni di filtri UV sono state rilevate per esempio nelle acque in prossimità di spiagge con un'alta affluenza turistica: isole Hawaii, Okinawa, Majorca, Vergini, nel Mar Baltico meridionale e nel Mar Mediterraneo (Astel et al., 2020; Bargar et al., 2015; Tashiro & Kameda, 2013; Tovar-Sánchez et al., 2013) raggiungendo in alcuni casi concentrazioni fino a 1.4 mg/L come nel caso del Benzofenone-3 (BP-3) nelle isole Vergini (Downs et al., 2016).

Alcuni filtri UV organici (ad esempio ossibenzone, octocrylene, benzofenone o etilesil triazone) sono noti per essere tossici per gli organismi acquatici (Downs et al., 2015;

Maipas et al., 2015; Paredes et al., 2014; Kim et al., 2014; Fent et al., 2010; Díaz-Cruz et al., 2009; Kunz et al., 2006) e mostrano effetti coerenti come interferenti endocrini.

Similmente diversi studi hanno evidenziato effetti negativi su organismi marini, prodotti anche da filtri UV inorganici (i.e. ossido di zinco, ZnO e diossido di titanio, TiO₂) (Yuan et al., 2022). Questi componenti inorganici sono generalmente utilizzati sotto forma di nanoparticelle (nano-TiO₂ e nano-ZnO, con dimensioni intorno a ≤ 100 nm) per una protezione più efficace e perché non lasciano una pellicola bianca sulla pelle (Osterwalder et al., 2014). Il nano-TiO₂ è il nanomateriale ingegnerizzato più prodotto con una produzione mondiale fino a 10.000 tonnellate nel 2010, mentre la produzione globale di nano-ZnO era compresa tra 100 e 1.000 tonnellate/anno nel 2010 (Piccinno et al., 2012). Entrambi sono utilizzati principalmente per la protezione dai raggi UV nei filtri solari (circa il 70% dell'uso totale; Piccinno et al., 2012).

Il biossido di titanio (TiO₂) e l'ossido di zinco (ZnO) sono tra i composti più abbondanti scaricati nell'ambiente (Miller et al., 2010), con potenziali conseguenze ecologiche sulla vita marina (Hazeem et al., 2015; Miller et al., 2012; Peng et al., 2011; Miller et al., 2011; Miller et al., 2010; Chen et al., 2010). È noto infatti che questi materiali inorganici generano specie reattive dell'ossigeno (ROS) e rilasciano ioni metallici nell'ambiente acquatico, che possono danneggiare gli organismi attraverso una varietà di effetti correlati (Hazeem et al., 2015; Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez., 2014; Peng et al., 2011; Carp et al., 2004). Miller et al. 2010, in una recente indagine, hanno riportato diversi effetti negativi causati da ZnO e TiO₂ su diverse specie di alghe

marine. Inoltre, è noto che ZnO e TiO₂ hanno effetti deleteri su pesci e invertebrati marini (Haynes et al., 2017; Blaise et al., 2008). Ad esempio l'ossido di zinco risulta avere effetti negativi sulle prime fasi dello sviluppo embrionale di *Paracentrotus lividus* a causa della dissoluzione in ioni metallici (Zn²⁺ e Zn(OH)⁺) nell'ambiente marino (Corinaldesi et al., 2017; Auffan et al., 2009). D'altro canto, le formulazioni solari non sono caratterizzate soltanto dalla presenza dei filtri UV organici e/o inorganici, ma constano anche di tutta una serie di altre componenti chimici al loro interno quali emollienti, emulsionanti, agenti filmogeni, booster, stimolatori sensoriali (He et al., 2018; Osterwalder et al., 2014) conservanti, regolatori di pH, agenti chelanti, fragranze ed antiossidanti (Bom et al., 2019). Tutti questi ingredienti miscelati insieme vanno a caratterizzare il prodotto finale. Questa *mixture* di sostanze, una volta immessa in ambiente marino, subisce dei processi di degradazione (chimica, biologica, fotochimica) che contribuiscono alla loro trasformazione (La Farre et al., 2008), generando composti secondari che potrebbero avere effetti negativi sulla vita marina (Santos et al., 2012). Inoltre molte delle componenti solari, a causa della natura lipofila (Díaz-Cruz & Barceló, 2009) tendono a bioaccumularsi negli animali acquatici (Langford & Thomas, 2008) raggiungendo maggiori concentrazioni nei livelli più alti della catena trofica (Chatzigianni et al., 2022).

Le creme solari infatti sono state identificate come una fonte significativa di nutrienti inorganici, principalmente PO₄³⁻ nelle acque marine e costiere, aumentando la possibilità di fioriture di alghe in acque oligotrofiche (Tovar-Sánchez et al., 2013) con conseguente eutrofizzazione (Casas-Beltrán et al., 2021). Questi cosmetici possono

anche essere fonte di sostanze ad alto impatto come i metalli (Zmozinski et al., 2016) molti dei quali (come Al, Zn, Mg, Fe, Mn, Cu, Cr e Pb) sono stati rilevati e quantificati nelle creme solari (Rodríguez-Romero et al., 2019; Tovar-Sánchez et al., 2013; Zachariadis et al., 2009).

La necessità di comprendere gli effetti ecotossicologici dei prodotti solari e la sinergia dei loro ingredienti una volta immessi negli ecosistemi marini diventa una priorità, poiché gli effetti a lungo termine sul biota marino sono in gran parte sconosciuti (Corsi et al., 2014). Inoltre, l'effetto *mixture* di tutti gli ingredienti che compongono una crema solare esiste e deve essere considerato e ottimizzato non solo durante la fase di sviluppo del prodotto stesso, ma anche in ulteriori fasi del ciclo di vita del prodotto poiché, ad esempio, in ambiente marino alcune combinazioni di ingredienti sono in grado di influire sulla dispersione ambientale del prodotto stesso (Tovar-Sanchez et al., 2019 ; Botta et al., 2011).

Alcuni studi hanno fornito evidenze sul fatto che il solo approccio analitico-chimico non fornisce strumenti sufficienti per definire l'impatto ambientale associato ai singoli inquinanti o alla loro miscela. Gli organismi marini appartenenti a differenti livelli trofici rispondono in modo differente ad un dato contaminante (Corinaldesi et al., 2017; Peredes et al., 2014), inoltre differenti fasi di sviluppo di un determinato organismo possono essere più o meno sensibili a quel dato inquinante rispetto all'adulto (Gambardella et al., 2021; Corinaldesi et al., 2018; Carballeira et al., 2012).

In questo contesto, è di estrema importanza effettuare studi che riguardino l'intera formulazione di un prodotto e non solo dei loro singoli componenti in quanto l'effetto combinato degli ingredienti sugli ecosistemi marini può essere differente da quello testato singolarmente come anche quello dei loro sottoprodotti (Labille et al., 2020). Inoltre è necessario effettuare rigorosi test scientifici su diversi modelli di organismi marini, sia su diversi livelli trofici che su diversi stadi di sviluppo dell'organismo, per capire come le creme solari possono influenzare la salute degli organismi marini e l'equilibrio dell'ambiente in cui vivono.

2. OBIETTIVI

L'obiettivo principale della seguente tesi è quello di valutare gli effetti di quattro differenti marche di prodotti solari, su organismi marini differenti appartenenti a diversi livelli della rete alimentare (i.e., microalghe, crostacei planctonici, stadi di sviluppo del riccio di mare).

Nello specifico, lo scopo della ricerca è quello di valutare il livello di ecompatibilità di quattro differenti marche di creme solari vendute a livello sia Europeo sia internazionale. I prodotti solari includono tre creme definite dalle aziende cosmetiche produttrici contenenti “naturali, organiche, ed eco-friendly” e una crema solare senza claim di eco-compatibilità.

Per raggiungere tale scopo, sono stati eseguiti esperimenti di laboratorio in acquario utilizzando il piccolo crostaceo *Artemia salina*, la microalga *Nannochloropsis salina* e il riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

3. MATERIALI E METODI

3.1 I Prodotti solari

I prodotti solari utilizzati nella sperimentazione includevano creme di differenti marche definite “naturali” ed *eco-friendly* (*tested in marine life conditions*) dalle case produttrici.

Di seguito sono riportati i quattro differenti prodotti solari, con lo stesso fattore di protezione (SPF), utilizzati nei test su i tre organismi marini (*A. salina*, *N. salina* e *P. lividus*), incluso l'elenco degli ingredienti per ogni prodotto selezionato espresso secondo una nomenclatura standard (INCI), e le informazioni fornite dall'azienda produttrice (Tab. 1).

Gli organismi marini modello utilizzati in questo studio sono: *Artemia salina* un piccolo crostaceo frequentemente utilizzato nei test ecotossicologici perché molto resiliente nel caso di condizioni ambientali avverse, con un ciclo di vita breve (3-6 mesi) e facile da allevare (Soltanian, 2007), è il taxon chiave nella catena trofica ipersalina dove è la specie dominante del macrozooplankton, e principale consumatore di fitoplancton (Lenormand et al., 2018); *Nannochloropsis salina*, una microalga che

rientra nel genere *Nannochloropsis* (Safafar et al., 2016), molto resiliente a perturbazioni ambientali (Geng et al., 2016) e *Paracentrotus lividus*. In particolare nel caso del riccio di mare è stato condotto un esperimento al fine di valutare l'impatto della crema solare TS sul suo sviluppo embrionale che rappresenta una specie chiave degli ecosistemi costieri del Mar Mediterraneo e dell'Atlantico nord-orientale (Boudouresque & Verlaque, 2020).

Ad ogni prodotto è stato assegnato un codice identificativo che non corrisponde al reale nome del prodotto.

Tabella 1. Elenco dei prodotti solari utilizzati nei test condotti su *A. salina*, *N. salina* e *P. lividus* con le informazioni/caratteristiche fornite dall'azienda produttrice per ogni prodotto solare selezionato.

n.d = informazione non presente

PRODOTTO SOLARE	TIPOLOGIA PRODOTTO	<i>LABELING/</i> INFORMAZIONI DELL' AZIENDA COSMETICA
ECO-SUN 1 (SPF 50+)	Crema solare eco-compatibile con la vita marina	<i>Tested in marine life conditions</i> Formula testata su un campione rappresentativo di organismi acquatici
ECO-SUN 2 (SPF 50+)	Crema solare eco-compatibile con la vita marina	<i>Ocean-respect</i> Filtri UV testati su 3 specie chiave della biodiversità marina.
ECO-SUN 3 (SPF 50+)	Crema solare eco-compatibile con la vita marina	<i>Ocean-respect</i> Formula testata su 2 specie di organismi marini (fito/zooplancton)

TS (SPF 50+)	Crema solare caratterizzata da filtri UV innovativi	Filtri UV innovativi ed un filtro UV brevettato
--------------	-----------------------------------------------------------	----------------------------------------------------

Crema SPF 50+ (ECO-SUN 1)

Prodotto solare etichettato dalla casa produttrice “*tested in marine life conditions*”, costituito da una formula nuova rispetto alle altre creme, testata su un campione rappresentativo di organismi acquatici risultando biodegradabile al 94% e quindi più ecosostenibile anche dal punto di vista del packaging (tubo con cartone e meno del 45% di plastica rispetto a flaconi simili). Nonostante queste informazioni fornite dalla casa produttrice non è stata riscontrata nessuna certificazione che attesti l’effettica eco-compatibilità di questo prodotto solare sulla vita marina.

Di seguito si riportano gli ingredienti presenti nella formulazione: Aqua/water, glycerin (umettante), bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (filtro UV) isopropyl palmitate (lubrificante per la pelle, funzione emolliente), ethylhexyl salicylate (filtro uv, con azione stabilizzante), pentylene glycol (umettante), butyl methoxydibenzoylmethane (agente stabilizzante), alcohol denat. (antimicrobico, agente di controllo della viscosità), stearic acid (tensioattivo) ethylhexyltriazone (filtro UV), Zea mays starch/corn starch (agente regolatore della viscosità), potassium cetyl phosphate (emulsionanti), diisopropyl sebacate (emolliente), Oryza sativa cera/rice bran wax (agente regolatore della viscosità), caprylyglycol (emolliente), acrylates/C10-30

alkyl acrylate crosspolymer (agente regolatore della viscosità), drometrizole trisiloxane (filtro UV), trisodium ethylenediamine disuccinate (agente chelante), tocopherol (antiossidante), xanthan gum (emulsionante), Butyrospermum parkii butter/sheea butter (agente regolatore della viscosità), myristic acid (emulsionante), sodium hyaluronate (umettante), citric acid, (regolatore Ph), parfum/fragrance.

Crema SPF 50+ (ECO-SUN 2)

La crema solare SUN 2 presenta una formulazione nuova; l'azienda produttrice sostiene che il prodotto sia ecologico perché presenta solo 4 filtri UV (-10% dei filtri rispetto alle referenze del 2019), ha una biodegradabilità ottimale, sulla base del test OECD-301B (o test di pronta biodegradabilità, cioè una sostanza è prontamente biodegradabile se immersa in un mezzo acquoso viene degradata completamente entro 28 giorni e per il 60% entro 10 giorni in condizioni aerobiche, misurando la quantità di CO₂ prodotta dalla sostanza) ed è *ocean-respect*, cioè rispetta l'ecosistema marino, i filtri UV contenuti nella formula sono stati testati su 3 specie chiave della biodiversità marina risultando né dannosi né tossici. Dato che non si hanno certificazioni riguardo ai test, non si può sapere se le creme sono realmente ecologiche. Ingredienti presenti: avene thermal spring water (avene aqua). c12-15 alkyl benzoate (agente antimicrobico), caprylic/capric triglyceride (emulsionante/emolliente). Dicaprylyl carbonate (emolliente). diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (filtro UV). Glycerin (umettante) ethylhexyl triazone (filtro UV). phenylene bis-diphenyltriazine

(filtro UV). water (aqua). bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (filtro UV). potassium cetyl phosphate (emulsionante). stearyl alcohol (tensioattivo). vp/eicosene copolymer (agente di controllo della viscosità). benzoic acid (conservante). caprylyl glycol (emolliente). glyceryl behenate (emulsionante). glyceryl dibehenate (emolliente). glyceryl stearate (tensioattivo). peg-100 stearate (tensioattivo). polyacrylate-13 (agente filmogeno). Polyisobutene (agente regolatore della viscosità). polysorbate 20 (tensioattivo). ppg-1-peg-9 lauryl glycol ether (tensioattivo). red 33 (ci 17200, colorante). sorbitan isostearate (emulsionante). Tocopherol (antiossidante). tocopheryl glucoside (emolliente). Tribehenin (emolliente). xanthan gum (tensioattivo).

Crema SPF 50+ (ECO-SUN 3)

Il prodotto solare è etichettato *ocean respect* dalla casa produttrice per evidenziare che la formulazione è stata progettata nel rispetto dell'ambiente marino effettuando vari test riguardanti la biodegradabilità(test OECD-301F: test che misura la quantità di O₂ consumato durante il processo di biodegradazione in condizioni aerobie entro 28 giorni); Test di ecotossicità su alghe (ISO 10253: test che determina l'inibizione della crescita causata da sostanze contenute in acqua) e su invertebrati acquatici (ISO 14669: test di tossicità letale acuta per valutare la qualità dell'acqua di mare utilizzando copepodi marini), importanti per lo sviluppo del corallo .Lo scopo di questi test ha permesso di determinare la concentrazione di prodotto sopra il quale si osserva

un effetto dannoso, dai risultati l'azienda ha affermato che la concentrazione contenuta nel prodotto era sotto il limite, ritenendo quindi la crema solare ecocompatibile, ma dato che non esistono informazioni su tali test, l'effettiva ec-compatibilità rimane dubbia. Ingredienti presenti: Aqua (Purified Water), Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate (filtro UV), Diisopropyl Adipate (emolliente), Ethylhexyl Methoxycinnamate (filtro UV), Dimethicone (emolliente), Cetearyl Alcohol (tensioattivo), Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (filtro UV), C12-15 Alkyl Benzoate (antimicrobico), Cetareth-20 (tensioattivo), Methyl Methacrylate Crosspolymer (agente filmogeno), Glycerin (umettante), Ethylhexyl Triazone (filtro UV), Silica (agente regolatore della viscosità), Polymethyl Methacrylate (agente filmogeno), Polyester-7 (agente regolatore della viscosità), Niacinamide (antiossidante), Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid (filtro UV), Aminomethyl Propanol (regolatore di pH), Arginine (regolatore di Ph), Beta-Carotene (antiossidante), Caprylhydroxamic Acid (agente chelante), Cetearyl Dimethicone Crosspolymer (agente stabilizzante del prodotto; favorisce l'emulsione), Daucus Carota Sativa (Carrot) Root Extract (antiossidante), Glycine Soja Oil (emolliente), Hydrogenated Phosphatidylcholine (emulsionante), Lecithin (emulsionante/emolliente), Lepidium Sativum Sprout Extract (umettante), Phenethyl Alcohol Squalane (antimicrobico), Tocopherol (antiossidante), Tocopheryl Acetate (antiossidante), 1,2-Hexanediol (solvente), Caprylyl Glycol (emolliente), Citric Acid (regolatore Ph), Disodium Edta (regolatore della viscosità/agente chelante), Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer (regolatore

della viscosità), Lysolecithin (emulsionante), Neopentyl Glycol Diheptanoate (emolliente), Pentylene Glycol (solvente), Polysorbate 60 (tensioattivo), Sodium Laureth Sulfate (tensioattivo), Sorbitan Isostearate (emulsionante), Xanthan Gum (tensioattivo), Phenoxyethanol (conservante), Parfum.

Crema solare SPF 50+ (TS)

Il prodotto è costituito da una nuova formula contenente filtri UV di ultima generazione (MBBT+Escalol ® S) aventi la capacità di assorbire più efficacemente le radiazioni UV solari responsabili degli effetti dannosi causati alla pelle, non viene specificato dalla casa produttrice se i nuovi filtri possano arrecare danni all'ecosistema marino.

Ingredienti presenti: Aqua (Water), Ethylhexyl Salicylate (filtro UV), Butyl Methoxydibenzoylmethane (filtro UV), Ethylhexyl Triazone (filtro UV) , Butyloctyl Salicylate (solvente), Diethylhexyl Butamido Triazone (filtro UV) , Silica (agente regolatore della viscosità) , Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (filtro UV), Dicaprylyl Carbonate (emolliente), Dibutyl Adipate (emolliente), Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate (filtro UV) , Cetareth-25 (tensioattivo) , Ceteth-2 (emulsionante) , Potassium Cetyl Phosphate (tensioattivo), Isodecyl Neopentanoate (emolliente) , Polyester-7 (agente regolatore della viscosità) , Methylpropanediol , 1,2-Hexanediol (solvente) , Glyceryl Behenate (emolliente) , Hydroxypropyl Starch Phosphate (agente regolatore della viscosità) , Sodium Polyacrylate (agente regolatore della viscosità), Neopentyl Glycol Diheptanoate

(emolliente),Hydroxyacetophenone(antiossidante),XanthanGum(tensioattivo),Diethyl hexylSyringylidenemalonate (antiossidante) , Bisabolol (antimicrobico), Oryzanol (antiossidante) , Tocopheryl Acetate (antiossidante) , Peucedanum ostruthium Leaf Extract (agente di cura della pelle) , Buddleja davidii leaf Extract (agente di cura della pelle) , Artemisia umbelliformis Extract (agente di cura della pelle) , Pinus pinaster Bark/Bud Extract (assorbe gli UV), Schisandra chinensis Fruit Extract (agente di cura della pelle), Tetrasodium Glutamate Diacetate (chelante), Diglycerin(umettante), Glycerin (agente regolatore della viscosità), Caprylic/Capric Triglyceride (emolliente), Sodium Hydroxide (regolatore Ph), Sodium Benzoate (conservante), Potassium Sorbate (conservante), Parfum (Fragrance).

3.2 Impatto delle creme solari su *Nannochloropsis salina*

L'alga *Nannochloropsis salina* è stata coltivata in acqua di mare prefiltrata ed autoclavata. La coltura algale è stata arricchita con il mezzo F/2 (Beirne et al., 2023) e mantenuta con fotoperiodo 12 ore di buio e 12 ore di luce, all'interno di una camera fitologica in condizioni di temperatura e luminosità controllate.

100 ml di coltura di *N. salina* è stata poi trasferita nei differenti sistemi sperimentali (n=3 beute da 250 mL per ogni prodotto e per i controlli) ed è stata mantenuta in condizioni ottimali sino al termine della sperimentazione.

Immediatamente dopo l'aggiunta del prodotto (t_0 = inizio dell'esperimento), e dopo 2, 5, 7 e 9 giorni dall'inizio della sperimentazione, è stata prelevata un'aliquota di coltura

algale dal trattato e dal controllo per valutare il tasso di crescita attraverso microscopia ottica (Zeiss, Axioplan, 40×).

Le differenze tra trattato e controllo nel tempo sono state valutate mediante analisi permutazionale della varianza (PERMANOVA) condotta utilizzando il software PRIMER6.

I livelli di impatto del prodotto solare sono stati definiti al termine dell'esperimento sulla base del rapporto tra abbondanza cellulare tra controllo e trattato considerando soltanto le differenze statisticamente significative tra trattato e controllo (Tab.2).



Figura 1. Sistema sperimentale per valutare l'effetto delle creme solare sulla microalga *Nannochloropsis salina*.

Tabella 2. Rapporto dell'abbondanza cellulare tra controllo e trattato e livelli di impatto dei prodotti solari sulla microalga *Nannochloropsis salina*.

Rapporto dell'abbondanza cellulare tra controllo e trattato	Livello di impatto dei prodotti
> 2.5	Molto grave
da 2.0 a 2.5	Grave
da 1.7 a 2.0	Moderato
da 1.1 a 2.0	Lieve
1.0	Assenza di impatto

3.3 Impatto delle creme solari su naupli di Artemia salina

Al fine di valutare l'impatto delle creme solari su naupli di *Artemia salina* e sul loro sviluppo, cisti di *A. salina* (Salt Lake Aqua Feed Premium, Great Salt Lake, Utah USA) sono state incubate in acqua di mare naturale prefiltrata a 20 µm (Altinok et al., 2016).

Le artemie in forma di cisti sono state idratate in acqua distillata a 4°C per 12 ore e lavate per separare le cisti affondate dalle cisti galleggianti. Le cisti affondate sono state lavate in acqua deionizzata e raccolte utilizzando un imbuto di Buchkner (Altinok et al., 2016). Tre grammi di cisti pretrattate sono state incubate in schiuditoi in vetro contenenti 1,5 L di acqua di mare a 30±1°C e schiuse in 24 ore (Altinok et al., 2016).

La luce continua è stata fornita con lampade fluorescenti.

Dopo 24 ore, l'aerazione è stata interrotta e le larve schiuse (Instar I) sono state trasferite nei microcosmi sperimentali (n=3 per ogni trattato e per il controllo)

contenenti acqua di mare autoclavata e prefiltrata 0.2 μm sono state incubate a 25°C per 72 ore.

Un totale di 450 larve per il trattato e controllo (3 sub-replicati da circa 150 larve ciascuno) è stato osservato allo stereomicroscopio (Leica Wilde M3B, ingrandimento 10 \times). Immediatamente dopo l'aggiunta del prodotto solare (t_0 = inizio dell'esperimento) e dopo 24 (t_{24}), 48 (t_{48}), e 72 (t_{72}) ore dall'inizio dell'esperimento è stato valutato lo stato di vitalità in termini di immobilizzazione degli organismi, i quali sono stati definiti immobilizzati dopo 15s di assenza di movimento (Thorel et al., 2020; Libralato et al., 2016).

La percentuale di mortalità è stata calcolata dal numero totale di larve morte per ciascuna concentrazione.

Le differenze tra trattato e controllo nel tempo sono state valutate mediante analisi permutazionale della varianza PERMANOVA (PRIMER6).

I livelli di impatto del prodotto solare sono stati definiti sulla base della percentuale di naupli non vitali come segue: 0 - 3 %= assenza di impatto; >3 - 25 %= impatto lieve; >25 - 40%= impatto moderato; >40-80%= impatto grave; >80-100%= molto grave (Tab. 3). Per valutare l'impatto dei prodotti solari sui naupli di *A. salina* al termine dell'esperimento (dopo 72 ore) sono stati considerati solo i valori risultati significativamente superiori al controllo.

Tabella 3. Percentuale di naupli di *A. salina* immobilizzati e relativi livelli di impatto dei prodotti solari utilizzati alla concentrazione finale di 50 $\mu\text{L L}^{-1}$

% Naupli immobilizzati dopo 72 h	Livello di impatto
0-3	Assente
>3-25	Lieve
>25-40	Moderato
>40-80	Grave
>80	Molto grave

Inoltre, al termine della sperimentazione (t_{72}) le larve di *A. salina* sono state utilizzate per studiare l'effetto dei prodotti solari sulle anomalie morfologiche dei naupli di *A. salina*.

I naupli di *A. salina*, dopo 24 ore dalla schiusa, si trovano generalmente nella fase larvale I o instar I, caratterizzata dal corpo brunastro con una lunghezza compresa tra i 400-500 μm , occhio naupliare (fotorecettore) rosso al centro della regione della testa; 3 paia di appendici: i) un paio di antenne primarie, con funzione sensoriale, nella parte alta della testa, ii) un paio di antenne secondarie (con funzione di locomozione e filtrazione), iii) un paio di mandibole (sotto le antenne secondarie, con funzione di alimentazione). In questa fase il nauplio non si alimenta ma prende energia dalle riserve

del sacco vitellino, poichè il sistema digerente non è ancora ben sviluppato. La zona ventrale è coperta da un grande *labrum* (serve ad assimilare il cibo: lo trasferisce dalle setole filtranti alla bocca) (G. Van Stappen, 1996).

Dopo circa 36 ore dalla schiusa si passa dal nauplio al meta-nauplio , fase larvale II o Instar II: l'ano si apre (Bustos-Obregon et al., 2010) ed inizia ad essere funzionante il tratto digerente ormai formato, l'organismo è pronto per filtrate piccole particelle di cibo (1-50 µm, alghe e batteri) (G. Van Stappen, 1996).

Alle 72 ore abbiamo la fase larvale III o early instar (fig. 2) le 3 paia di appendici sono ben sviluppate, il tratto digestivo ben formato e lineare, tipico di questo stadio (Sourgelous et al., 1984).

Le anomalie morfologiche dei naupli di *A. salina* esposte a ciascun prodotto solare sono state osservate sotto ingrandimento (40x) utilizzando un microscopio ottico (Zeiss, Axioplan). Al termine della sperimentazione (72 ore) la larve sono state osservate al microscopio ottico per valutare la percentuale di anomalie morfologiche riscontrate nei sistemi trattati e in quelli non trattati.

I metanaupli con sviluppo normale di *A. salina* dopo 72 ore dalla schiusa presentano un occhio naupliare al centro del capo (Fig. 2.1), formato da 3 ocelli pigmentati, di colore scuro e forma tonda. (Sourgelous et al., 1984); 3 paia di appendici ben sviluppate: antenne primarie (Fig. 2.2), antenne secondarie (Fig. 2.3) organi natatori equipaggiati di setole (Fig. 2.4) e le mandibole (Fig. 2.5), con incisori periferici utilizzati per processare meccanicamente le particelle di cibo; il tratto digestivo risulta

ben sviluppato e lineare tipico di questo stadio (Fig. 2.6) Bustos-Obregon et al 2010; regione del telson ben formata, in cui vengono prodotti i segmenti del corpo e l'individuo matura (Fig. 2.7); ano (Fig. 2.8); presenza nella regione del tronco di segmenti toracici (Fig. 2.9)

Abbiamo inoltre abbiamo definito i livelli di impatto dei prodotti solari sulla base della percentuale di anomalie embrionali e sulle analisi statistiche, come segue:

0-15%: nessun impatto, >15 - 30 %= impatto lieve; >30 - 40%= impatto moderato;

>40-80%= impatto grave; >80-100%= molto grave



Figura 2. Metanauplio di *A. salina* fase instar III. Larve con sviluppo normale 72 ore dopo la schiusa: occhio naupliare al centro del capo di colore scuro e forma tonda (1), antenne primarie (2), antenne secondarie (3) equipaggiate di setole (4), mandibole (5),

tratto digestivo ben sviluppato e lineare (6); regione del telson ben formata, (7); ano (8), segmenti toracici (9).

Le anomalie morfologiche riscontrate dopo 72 ore di esposizione ai differenti prodotti solari sono state suddivise in 7 tipologie, come descritte di seguito:

- *Anomalie dell'occhio naupliare (AO)*: perdita di colore e forma non più rotonda.

Nelle larve sane l'occhio naupliare è rotondo e di colore rosso o nero (Fig. 3 A).

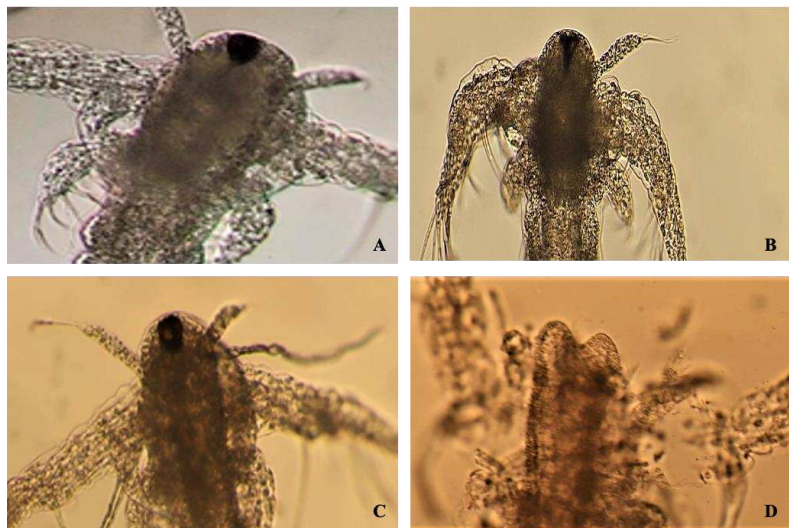


Figura 3. Larva di *A. salina* fase instar III. (A) Larve con sviluppo normale dell'occhio naupliare; larve che presentano anomalie dell'occhio naupliare quali forma irregolare (B), depigmentazione (C) ed assenza (D).

- *Anomalie delle antenne primarie (AA1)*: chiamate anche antennule, sono organi con funzione sensoriale presenti sul capo dell'organismo (Fig. 4 A 1); le anomalie delle antenne primarie riscontrate sono mostrate in figura 4: assenza (Fig 4 D), sviluppo

asimmetrico (Fig. 4 B ed E) dell'apparato delle antenne primarie o degradate (Fig. 4 C).

- *Anomalie delle antenne secondarie (AA2)*: sono organi natatori equipaggiati di setole (Fig. 4 A 2), si possono riscontrare antenne secondarie con sviluppo asimmetrico (Fig. 4 E), o perdita di parti di esse quali enditi, endopodi, esopodi che costituiscono le antenne secondarie (Fig. 4 C).



Figura 4. Larva di *A. salina* fase instar III. Larve con sviluppo normale dell'apparato delle antenne (A) primarie (1) e secondarie (2). Larve di *A. salina* che presentano anomalie all'apparato delle antenne primarie e secondarie (B-E).

Anomalie intestino (AI): nei metanaupli sani l'apparato intestinale è ben sviluppato e di forma lineare (Fig. 5 A), se l'organismo non si è alimentato è vuoto. Tra le anomalie

del tratto intestinale abbiamo riscontrato: presenza di restringimenti o allargamenti anomali, lunghezza ridotta (Fig. 5 B e C).

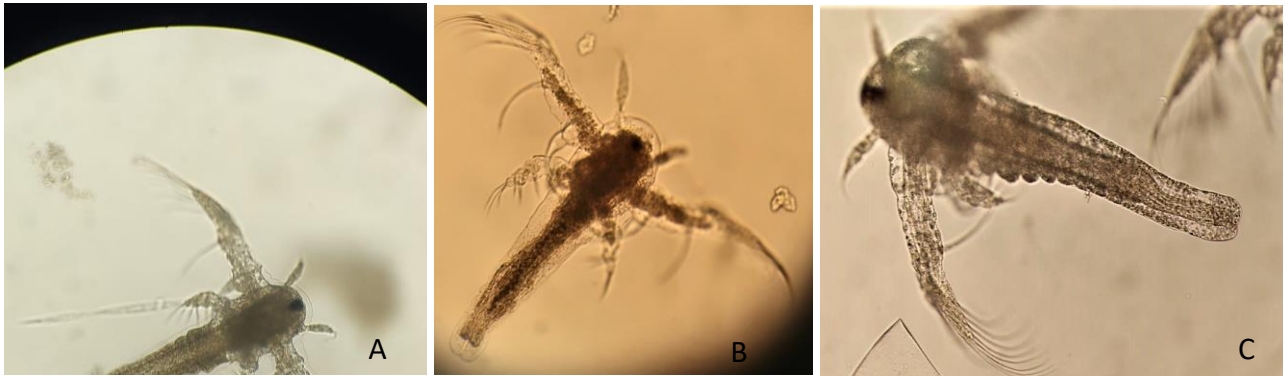


Figura 5. Metanaupli di *A. salina* fase instar III 72 ore dalla schiusa. Larve con sviluppo regolare dell'intestino (A); Larve di *A. salina* che presentano anomalie intestinali (B-C)

- *Anomalie corpo (AC)*: In figura 6 A è mostrata una larva di *A. salina* con uno sviluppo regolare del corpo. Tra le anomalie del corpo riscontrate: corpo di dimensioni ridotte (Fig. 6 B), segmenti toracici non sono sviluppati o presentano uno sviluppo asimmetrico (Fig. 6 C), perdita della struttura del torace (Fig. 6 F e D). Inoltre molte larve presentavano un'elevata degradazione dell'esoscheletro (Fig. 6 E).

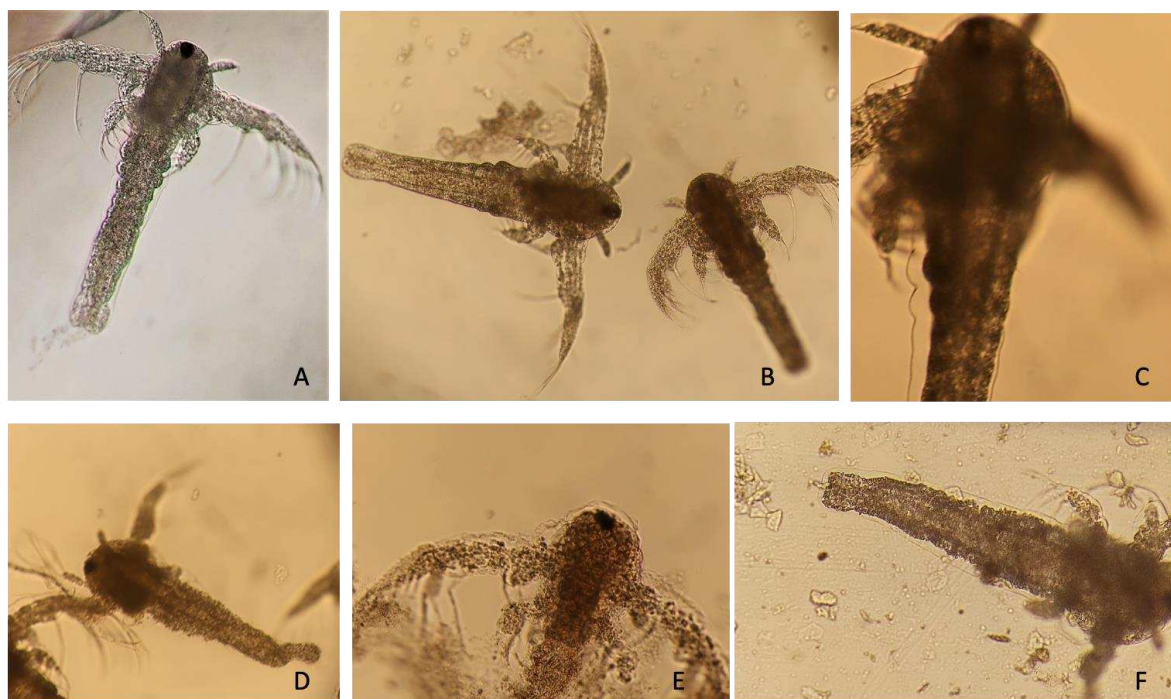


Figura 6. Metanaupli di *A. salina* fase instar III dopo 72 ore dalla schiusa. Larve con sviluppo regolare del corpo (A). Larve con anomalie del tronco: corpo di dimensioni ridotte (B), segmenti toracici con sviluppo asimmetrico (C), perdita della struttura del torace (F e D), elevata degradazione dell'esoscheletro (E).

- *Anomalie mandibole (AM)*: In figura 7 A è mostrata una larva di *A. salina* con uno sviluppo regolare delle mandibole. Tra le anomalie riscontrate: mandibole degradate o sviluppate asimmetricamente (Fig. 7 B e D), mandibole con incisori periferici con lunghezza ridotta (Fig. 7 C).

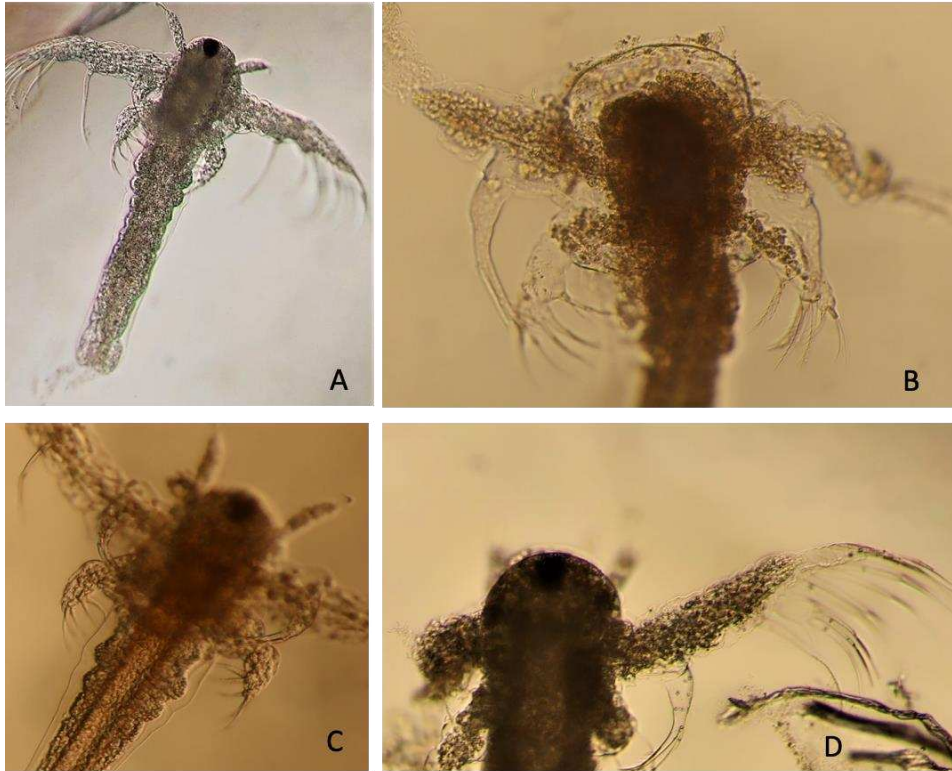


Figura 7. Metanaupli di *A. salina* fase instar III dopo 72 ore dalla schiusa. Larve con sviluppo regolare delle mandibole (A). Larve con anomalie delle mandibole: mandibole degradate o sviluppate asimmetricamente (B e D), mandibole con incisori periferici con lunghezza ridotta (C).

- *Anomalie telson (ATLN)*: è la regione nella parte finale del tronco, in figura 8 A e B è mostrato un metanauplio con sviluppo regolare della regione del telson; nella figura 8 C-F sono mostrate le anomalie morfologiche del telson riscontrate in questo studio: telson con sviluppo anomalo/assente (C-F)

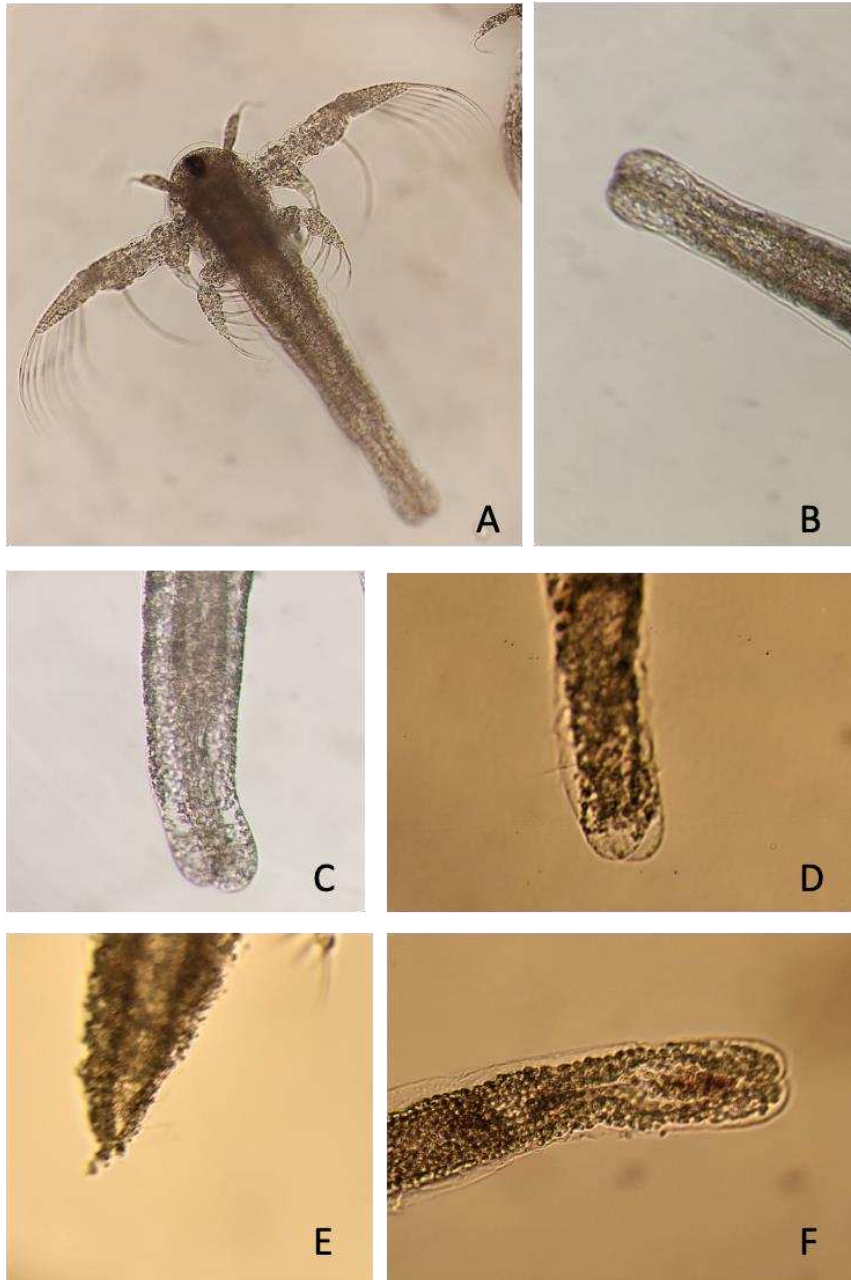


Figura 8. Metanaupli di *A. salina* fase instar III dopo 72 ore dalla schiusa. Larve con sviluppo regolare della regione del telson (A e B). Larve con con sviluppo anomalo o assenza della regione del telson (C-F)

3.4 Impatto delle creme solari sullo sviluppo embrionale di *Paracentrotus lividus*

*3.4.1. Campionamento di *P. lividus* e induzione della deposizione delle uova*

Esemplari adulti di *P. lividus* sono stati raccolti durante la stagione riproduttiva lungo la costa del Mare Adriatico Centrale (43°37'11.29"N 13°31'52.9"E, Mar Mediterraneo, 11 °C, Salinità 38.3, pH 8.2), e immediatamente portato in laboratorio in sacche refrigerate (circa 8-10 °C).

In laboratorio, i campioni sono stati mantenuti in acquari con acqua di mare filtrata (FSW; utilizzando filtri per siringa con pori da 0,22 µm, Aisimo®) per almeno una settimana, a 14 °C e con gli stessi parametri di salinità e pH registrati al momento del campionamento per consentire l'adattamento ottimale.

La deposizione delle uova dei gameti è stata ottenuta come descritto da Amemiya (1996) mediante iniezione orale di cloruro di acetilcolina 0,5 M diluito 1:1000 in acqua di mare autoclavata e ultrafiltrata (UFSW; utilizzando filtri per siringa Anotop® con pori di 0,02 µm, Whatman, Springfield Mill, UK.). Gli ovuli sono stati raccolti in contenitori di vetro sterilizzati (n = 6) con 20 mL di FSW, mentre lo sperma è stato raccolto secco dai pori genitali, suddiviso in aliquote (2 mL) e mantenuto a 4 °C. I gameti di tre diversi esemplari maschi e tre femmine sono stati mescolati. In particolare, 130 µL di UFSW contenenti 3000 uova (contate al microscopio, Zeiss Axioskop, ingrandimento 10×) sono state miscelate con 100 µL di spermatozoi diluiti 1:10 con UFSW.

Gli esperimenti sono stati eseguiti secondo i test validati dall'ISO e secondo Falugi et al. (2008).

Abbiamo utilizzato vasche sterili contenenti 100 mL di FSW e 230 μ L di gameti misti alla temperatura di 18 °C ottimale per lo sviluppo sincrono delle uova di riccio.

La crema solare tradizionale ad una concentrazione finale di 50 μ L L⁻¹ in acqua di mare è stata aggiunta a sistemi replicati (n = 3) per ogni tempo di campionamento e rispetto a sistemi non trattati (senza aggiunta di sostanze, n = 3) utilizzati come controlli. Sottocampioni da ciascun sistema trattato (aggiunta di crema solare) e non trattato sono stati raccolti dopo l'aggiunta del prodotto solare (t_0 = dopo 20 minuti dalla fertilizzazione), dopo 3 h (t_3 , corrispondente a stadio di morula) e 24 h (t_{24} , corrispondente allo stadio di gastrula) dall'inizio dell'esperimento. Tutti i sottocampioni sono stati fissati con paraformaldeide (PFA 4%, pH 7,4) e su un totale di 600 embrioni per ciascun sistema è stato determinato il numero di embrioni anomali e le differenti anomalie riscontrate mediante microscopio ottico (Nikon eclipse Ni, ingrandimento 10 \times).

L'uso di un disegno sperimentale di campionamento basato su repliche indipendenti era necessario per evitare la pseudo-replicazione consentendoci di eseguire solide analisi statistiche e di aumentare le informazioni sulla variabilità del background naturale degli organismi modello testati.

3.4.2. *Analisi morfologica di embrioni di P. lividus*

Lo stato di salute degli embrioni è stato valutato utilizzando un microscopio ottico (Zeiss Axioskop, ingrandimento 10×) e classificato in base alla morfologia e alla sincronicità dello sviluppo embrionale rispetto ai controlli (Gambardella et al., 2021; Corinaldesi et al., 2017).

In dettaglio, gli embrioni erano considerati normali se mostravano una corretta struttura dell'archenteron e delle cellule migratorie che entravano nel celoma (Gambardella et al., 2021; Corinaldesi et al., 2017).

Sono state analizzate le anomalie morfologiche degli embrioni e sono stati identificati 10 diversi tipi di anomalie secondo Gambardella et al. (2021): forma irregolare, grave ritardo dello sviluppo a 24 ore dalla fecondazione, divisione asimmetrica, uova non fecondate, membrana con bolle o materiale denso nello spazio perivitellino, embrioni non sviluppati/bloccati, necrotici o apoptotici, esogastrule, shock di penetrazione degli spermatozoi e perdita di adesione tra blastomeri.

Tali malformazioni sono state classificate in base al grado di alterazione embrionale (Gambardella et al., 2021) per stabilire la gravità dell'impatto. Sono stati utilizzati quattro livelli di tossicità (da 0 a 3), con il livello 0 caratterizzato da normale sviluppo di embrioni e il livello 3 che rappresenta il tipo di danno più grave, includendo anche i livelli 1 (danno lieve) e 2 (danno moderato) con riportato in tabella 4.

Pertanto, al termine dell'esperimento (t_{24h}), abbiamo determinato la frequenza delle anomalie per ogni grado di alterazione embrionale e larvale e calcolato l'indice di

impatto contaminante (ICI, Gambardella et al., 2021) dei trattati e dei sistemi di controllo.

$$\text{ICI} = [(0 \times \% \text{livello } 0 + 1 \times \% \text{livello } 1 + 2 \times \% \text{livello } 2 + 3 \times \% \text{livello } 3) / 100]$$

Partendo dall'indice di impatto contaminante (ICI) dei trattati e dei sistemi di controllo, abbiamo integrato questa formula, confrontando la frequenza e il grado di alterazione embrionale per ogni trattamento con i controlli (ICI*), come segue:

$$\text{ICI}^* = (\text{ICI trattato} / \text{ICI controllo}).$$

L'indice di impatto contaminante (ICI*) può avere valori da 0 a infinito, dove valore 1 significa che la frequenza di anomalie per ogni grado di alterazione embrionale e larvale nel trattamento è uguale alla loro frequenza nel controllo.

Abbiamo inoltre assegnato una scala di valori basata sui risultati ottenuti dall'indice di impatto e sulle analisi statistiche che vanno da 0 – 1,4 nessun impatto (100 - 70 % embrioni sani) a > 2,5 alto impatto (< 50 % embrioni sani), compreso, i valori vanno da >1,4 a 1,8 impatto lieve (<70 - 60 % embrioni sani) e da >1,8 a 2,5 impatto moderato (<60 - 50 % embrioni sani).

Tabella 4. Livelli utilizzati per valutare l’impatto del prodotto solare su embrioni di *P. lividus*.

ICI	Impatto ambientale
0	Assenza di impatto
$0 < x < 1$	Lieve
$1 \leq x < 2$	Moderato
$2 \leq x \leq 3$	Grave

4. RISULTATI

4.1. Effetti delle creme solari su *Nannochloropsis salina*

I risultati dei test condotti su *Nannochloropsis salina* sono stati ottenuti utilizzando una concentrazione finale del prodotto solare di $50 \mu\text{L L}^{-1}$ in acqua di mare (Fig. 9)

Nei sistemi di controllo dopo i primi due giorni di fase di latenza (o fase *lag*) i valori dell’abbondanza cellulare aumentavano significativamente nel tempo (Fig. 9).

All’inizio dell’esperimento (t_0) e dopo 2 giorni, non si sono osservate differenze significative tra il controllo e gli altri trattati ($p > 0.05$).

Al contrario dopo 5 giorni dall’aggiunta delle creme solari (t_5) si è osservata una

significativa diminuzione dell'abbondanza cellulare rispetto al controllo ($p < 0.001$) nei sistemi sperimentali trattati con TS, ECO-SUN 2 ed ECO-SUN 3. Questo pattern era ben visibile anche dopo 7 (t_7), 9 (t_9) e 12 (t_{12}) giorni dall'inizio dell'esperimento, dove l'abbondanza delle cellule algali risultava essere significativamente minore ($p < 0.001$) rispetto ai sistemi di controllo (Fig. 9).

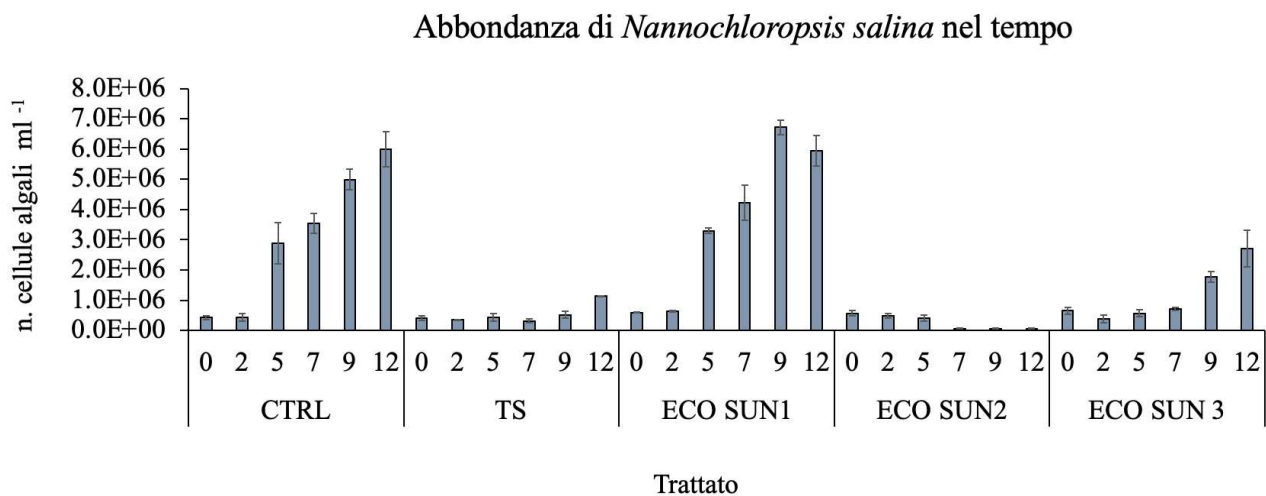


Figura 9: Abbondanza delle cellule algali di *Nannochloropsis salina* trattate con i differenti prodotti solari alla concentrazione finale di $50 \mu\text{L}^{-1}$ e nei sistemi di controllo ,all'inizio dell'esperimento (t_0) dopo 2, 5, 9 e 12 giorni di sperimentazione. \pm Deviazione standard

In particolar modo, colture algali di *N. salina* esposte al prodotto solare ECO-SUN 2 (Fig. 9) mostravano una diminuzione significativa dell'abbondanza algale rispetto ai sistemi di controllo ($p > 0.001$), dal quinto giorno (t_5) sino al termine dell'esposizione (t_{12} ; Fig. 9), raggiungendo valori 55, 80 e 115 volte inferiori (Fig. 9) rispetto ai sistemi di controllo, rispettivamente 7(t_7), 9 (t_9) e 12 (t_{12}) dall'inizio dell'esperimento. Al contrario *N. salina* esposta al prodotto solare ECO-SUN 3 dopo 9 (t_9) e 12 (t_{12}) giorni

dall'aggiunta del prodotto mostrava un incremento significativo nell'abbondanza cellulare se paragonata ai valori riscontrati nei tempi precedenti (dopo 5 e 7 giorni dall'inizio dell'esperimento), tali valori risultavano comunque inferiori rispetto al controllo.

Al contrario l'abbondanza cellulare delle colture algali di *N. salina* esposte al prodotto solare ECO-SUN 1 non diminuivano significativamente nel tempo ($p > 0.05$) rispetto al controllo, durante tutta la sperimentazione (Fig. 9).

L'impatto sulle alghe dei differenti prodotti solari dopo 12 giorni di esposizione è riportato nella tabella 5.

Tabella 5. Rapporto dell'abbondanza cellulare tra controllo e trattati dopo 12 giorni di esposizione e relativo livello di impatto su *N. salina*.

Trattato	Rapporto dell'abbondanza cellulare tra controllo e trattato	Livello di impatto dei prodotti
TS	5.3	Grave
ECO SUN 1	1.0	Assenza di impatto
ECO SUN 2	115.1	Molto grave
ECO SUN 3	2.2	Moderato

In figura 10 è mostrato il tasso di crescita delle cellule di *N. salina* esposte ai differenti prodotti solari e nei sistemi di controllo.

Il controllo mostrava un tasso di crescita tra l'inizio e la fine dell'esperimento pari a 0.22, valori simili erano riscontrati nei sistemi trattati con il prodotto solare ECO-SUN 1 (0.19), che non presentava variazioni significative nel tasso di crescita al

termine della sperimentazione rispetto al controllo ($p>0.05$)

Al contrario sistemi trattati con TS, ECO-SUN 2 e ECO-SUN 3 mostravano una diminuzione significativa del tasso di crescita di *N. salina* rispetto al controllo al termine della sperimentazione (t_{12} ; $p<0.01$), con valori rispettivamente di 0.08, 0.00 e 0.12 rispetto al controllo al termine dell'esperimento (Fig.10).

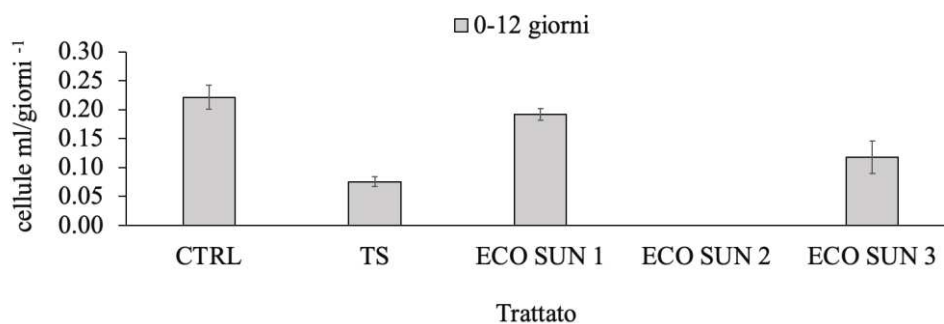


Figura 10. Tasso di crescita delle cellule algali di *Nannochloropsis salina* trattate con i differenti prodotti solari alla concentrazione finale di 50 $\mu\text{l L}^{-1}$ e nei sistemi di controllo dopo 12 giorni di sperimentazione. \pm Deviazione standard

4.2. Effetti delle creme solari su naupli di *A. salina*

I risultati dei test condotti sui naupli di *Artemia salina* nei primi stadi di sviluppo alla concentrazione finale di 50 $\mu\text{l L}^{-1}$ di acqua di mare sono mostrati in figura 11.

Dal confronto con i sistemi di controllo tutti i prodotti solari testati alla concentrazione finale di 50 $\mu\text{l L}^{-1}$ determinano effetti negativi sulla vitalità del totale di individui testati di *A. salina* rispetto ai sistemi di controllo dopo 72 ore di esposizione (Fig. 11 A).

In particolare il trattato TS, già dopo 24 ore (t_{24}) dall'aggiunta, causava un incremento significativo ($p < 0.01$, Fig. 11 B) rispetto al controllo nella percentuali di naupli non vitali, e gli effetti diventavano più gravi dopo 48 e 72 ore di esposizione ($p < 0.001$), dove la percentuale di naupli non vitali raggiungeva circa il 27 % ed il 17% rispettivamente.

Inoltre, dopo 72 ore (t_{72}) dall'aggiunta del prodotto solare TS si osservava una diminuzione significativa rispetto al controllo della vitalità dei naupli ($p < 0.001$), con circa il 50 % del totale di individui testati non vitale (Fig. 11 A).

Similmente i sistemi sperimentali trattati con il prodotti ECO-SUN 1 mostravano un aumento significativo della percentuale di naupli non vitali rispetto al controllo ($p < 0.05$; Fig. 11 B) dopo 24 ore (t_{24}) dall'aggiunta del prodotto, valori che rimanevano significativi anche dopo 48 (t_{48}) e 72 (t_{72}) ore dall'inizio dell'esperimento ($p < 0.01$). Al termine della sperimentazione (t_{72}), come mostrato in figura 11 A, la percentuale totale di inaupli non vitali di *A. salina* trattati con ECO-SUN 1 aumentava significativamente rispetto al controllo ($p < 0.01$; circa 21 %).

Il prodotto solare ECO-SUN 2, causava un aumento significativo della percentuale di naupli non vitali rispetto al controllo ($p < 0.001$; Fig. 11 B) dopo 48 ore (t_{48}) dall'aggiunta del prodotto, con valori che rimanevano significativi anche al termine della sperimentazione (t_{72} , $p < 0.001$). Infatti, dopo 72 ore dall'aggiunta del prodotto solare ECO-SUN 2 si è osservato un incremento significativo della percentuale di naupli non vitali rispetto al controllo ($p < 0.001$; 96.5 %; Fig. 11 A).

Il trattato ECO-SUN 3 determinava un incremento significativo della percentuale di naupli di *A. salina* non vitali dopo solo 48 ore dall'inizio dell'esperimento (t_{48} ; $p < 0.01$) ma tali valori non mostravano variazioni significative rispetto al controllo al termine della sperimentazione (t_{72}). D'altro canto dopo 72 ore di esposizione la percentuale totale di naupli non vitali mostrava differenze significative rispetto al controllo ($p < 0.01$), con valori pari al 4% del totale di individui testati (Fig. 11 A).

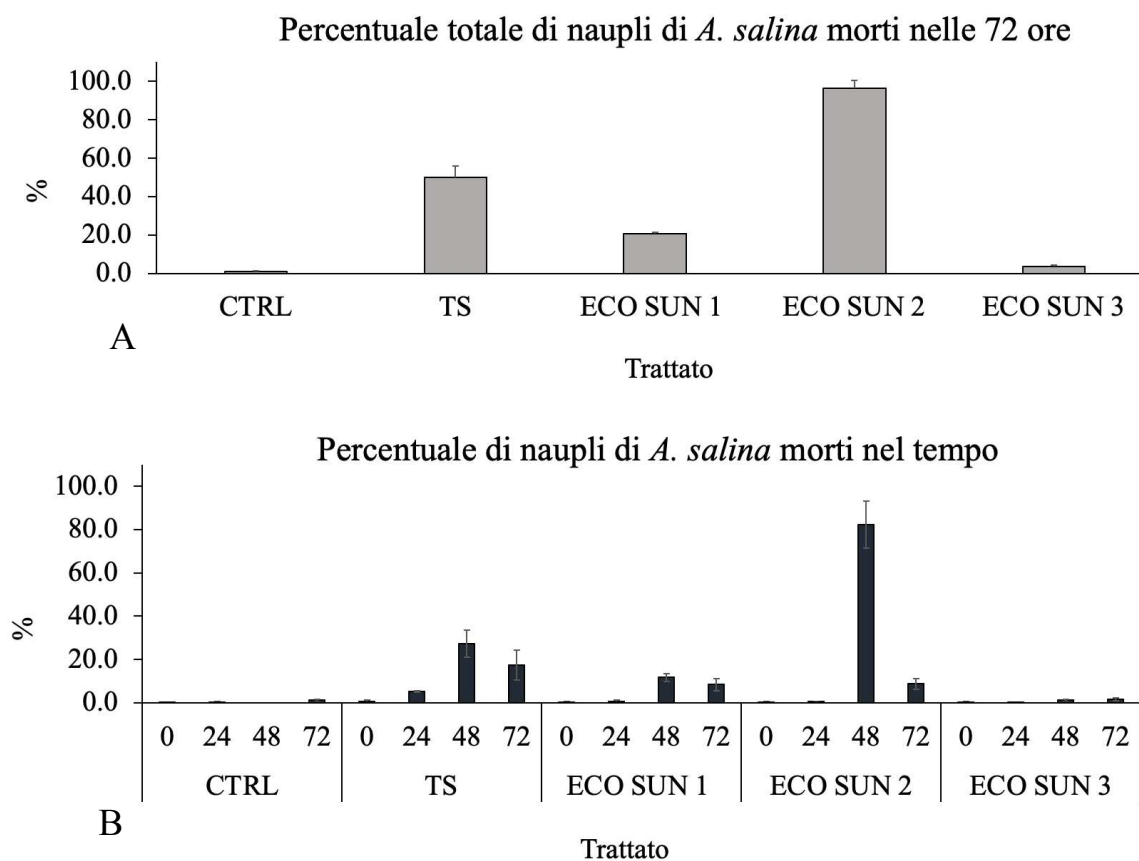


Figura 11. Naupli di *Artemia salina* non vitali. (A) Percentuale relativa di naupli non vitali per ogni tempo di campionamento (dopo 24, 48 e 72 ore di sperimentazione), e (B) percentuale totale di naupli non vitali dopo 72 ore di esposizione a differenti prodotti solari alla concentrazione di $50 \mu\text{l L}^{-1}$ e nei sistemi di controllo. \pm Deviazione standard

Tabella 6. Livello di impatto dei differenti prodotti solari su naupli di *A. salina* alla concentrazione di $50 \mu\text{l L}^{-1}$. Statisticamente significativo.

Trattato	% Naupli immobilizzati dopo 72 h	Livello di impatto
CONTROLLO	1.1	Assente
TS	49.8	Moderato/Grave
ECO SUN 1	20.8	Lieve
ECO SUN 2	96.5	Molto grave
ECO SUN 3	3.6	Lieve

I risultati dell'analisi morfologica dei naupli di *A. salina* esposti e non esposti ai 4 prodotti solari al termine della sperimentazione sono riportati in figura 12.

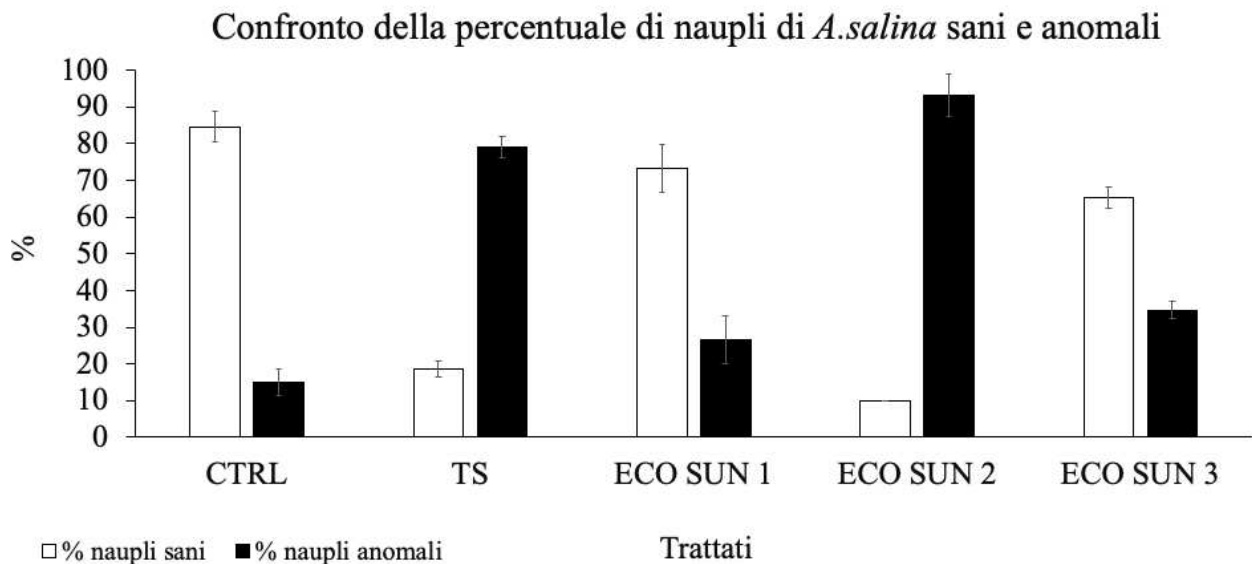


Figura 12. Percentuale (%) di naupli di *A. salina* sani ed anomali dopo 72 ore di esposizione a differenti prodotti solari alla concentrazione di $50 \mu\text{l L}^{-1}$ e nei sistemi di controllo. \pm Deviazione standard

Nei sistemi non trattati la percentuale di anomalie larvali riscontrate al termine della sperimentazione era pari al 15 % dei naupli totali osservati, mentre l'85% mostrava uno sviluppo regolare ed assenza di anomalie morfologiche (Tab. 7).

Al contrario tutti i trattati causavano un aumento significativo della percentuale di anomalie larvali al termine della sperimentazione (t_{72}) rispetto al controllo (Fig. 12).

Nello specifico se confrontati con i sistemi di controllo, dopo 72 ore dall'inizio dell'esperimento, i naupli esposti ai prodotti solari TS ed ECO-SUN 2, mostravano un aumento significativo di anomalie larvali ($p > 0.001$), raggiungendo rispettivamente valori del 79 e 93% di anomalie riscontrate (Tab.7).

Tabella 7. Percentuale di naupli di *A. salina* sani ed anomali e relativo livello di impatto determinato per i sistemi di controllo e per i differenti prodotti solari alla concentrazione di $50 \mu\text{l L}^{-1}$.

Trattato	Anomalie larvali di <i>A. salina</i> (%)	Livello di impatto su metanaupli di <i>A. salina</i> dopo 72 ore
CTRL	15	Assente
TS	79	Grave
ECO SUN 1	27	Lieve
ECO SUN 2	93	Molto grave
ECO SUN 3	35	Moderato

Similmente dopo 72 ore dall'aggiunta dei prodotti solari ECO-SUN 1 e ECO-SUN 3 si osserva un incremento significativo rispetto al controllo nella percentuale di anomalie larvali (rispettivamente $p < 0.05$ e $p < 0.01$), seppur i valori riscontrati (27 e 35 % rispettivamente) risultano essere più bassi rispetto ai trattamenti TS e ECO-SUN 2 (Tab. 7).



Figura 13. Anomalie larvali riscontrate dopo 72 ore di esposizione a differenti prodotti solari alla concentrazione di $50 \mu\text{l L}^{-1}$ (B - I) e nei sistemi di controllo (A). Anomalie dell' intestino (B-C); anomalie del corpo (B, G e H); anomalie dell'apparato delle antenne primarie e secondarie (D-G e H); anomalie dell'occhio naupliare (B, F); anomalie delle mandibole (D-G), larve degradate (I). Barra $100 \mu\text{m}$

Le principali anomalie riscontrate nei sistemi trattati con i 4 differenti prodotti solari (Fig. 13) sono state: anomalie dell' intestino (B-C), anomalie del corpo (B, G e H), anomalie dell'apparato delle antenne primarie e secondarie (D-G e H), anomalie dell'occhio naupliare (B, F), anomalie delle mandibole (D-G) e larve con tessuti degradati (I).

Inoltre nei sistemi trattati con i differenti prodotti solari sono state osservati, dopo 72 ore di esposizione, metanaupli di *A. salina* con l'apparato digerente pieno, dovuto all'ingestione di crema solare, come mostrato in figura 14.



Figura 14. Larve di *A.salina* dopo 72 ore di esposizione a differenti prodotti solari alla concentrazione di $50 \mu\text{l L}^{-1}$ (A - C). Le larve presentano l'apparato digerente pieno, dovuto all'ingestione di crema solare (freccia nera). Barra $100 \mu\text{m}$

4.2. Effetti delle creme solari sullo sviluppo embrionale di *P. lividus*

Al fine di approfondire e valutare maggiormente gli effetti del prodotto solare tradizionale (TS) sull'ecosistema marino costiero, è stato condotto un'ulteriore esperimento di laboratorio sullo sviluppo embrionale del riccio di mare *P. lividus*. I risultati di questo studio sono mostrati in figura 15.

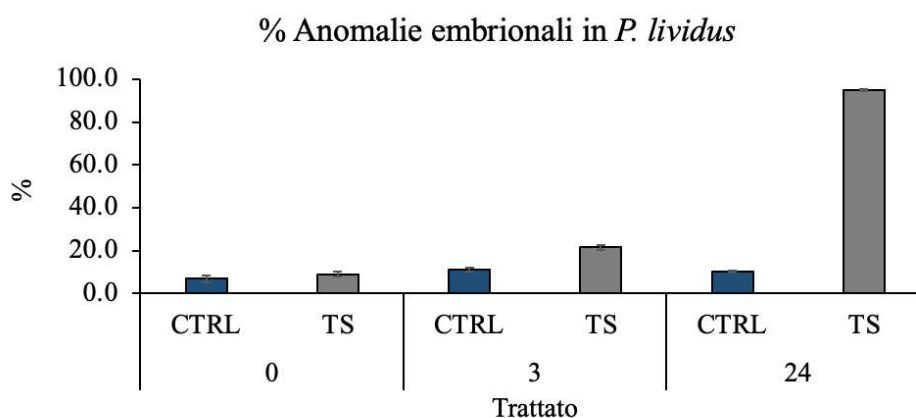


Figura 15. Embrioni anomali (%) di *P. lividus* dopo 20 minuti dalla fertilizzazione (t_0), dopo 3 (t_3) e 24 ore (t_{24}), nei sistemi trattati con differenti prodotti solari alla concentrazione finale di $50 \mu\text{l L}^{-1}$ ed in quelli di controllo. \pm Deviazione standard

Dopo 20 minuti dall'inizio dell'esperimento (t_0) non si sono osservate variazioni significative tra trattato e controllo nella percentuale di embrioni anomali (Fig.15).

Al contrario dopo 3 ore (t_3) dall'aggiunta del prodotto solare la percentuale di anomalie risultava significativamente più alta ($p < 0.01$) rispetto ai sistemi di controllo con circa il 22% di embrioni anomali; tali anomalie aumentavano notevolmente rispetto al

controllo dopo 24 ore di esposizione ($p < 0.001$), fino a raggiungere valori pari a circa il 94% (Fig.15).

Dall'analisi morfologica delle anomalie embrionali emerge che il prodotto solare TS determinava un impatto sullo sviluppo embrionale del riccio di mare *P. lividus* (Tab. 8; Fig. 16) con una percentuale maggiore di anomalie appartenenti ad un livello di alterazione intermedio di tipo 1 e 2 (i.e. anomalie nella forma degli embrioni e ritardo nello sviluppo) ed un livello di alterazione grave di tipo 3 (i.e. necrosi, esogastrula)

Nello specifico in figura 16 sono illustrate le principali tipologie di anomalie riscontrate dopo 24 ore di esposizione al prodotto solare TS.

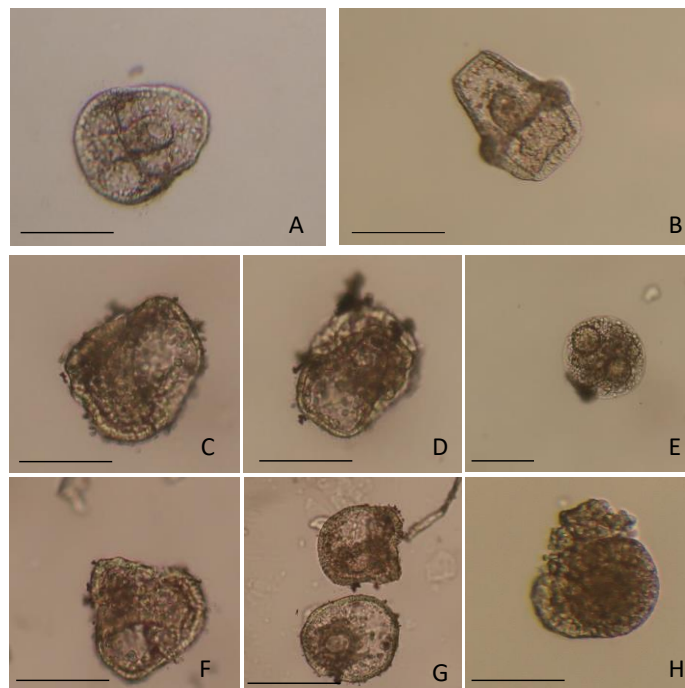


Figura 16. Embrioni anomali (%) di *P. lividus* dopo 24 ore (t_{24}) di esposizione ai differenti prodotti solari alla concentrazione finale di $50 \mu\text{l L}^{-1}$ (C-H) ed in quelli di controllo (A-B). Embrioni con sviluppo regolare allo stadio di prisma e pre-pluteo

(A e B); Embrione malformato allo stadio di prisma, con anomalia dell'archenteron (C-D); zigote morto, bloccato nelle prime fasi di fecondazione (E); embrione anomalo allo stadio di prisma con zone di necrosi cellulare (F); embrione con severo ritardo nello sviluppo allo stadio di gastrula con malformazione dell'archenteron e forma irregolare (G); esogastrula (H).

Tabella 8. Indice di impatto ambientale relativo alle anomalie embrionali di *P. lividus* determinato per i sistemi di controllo e per il prodotto solare TS alla concentrazione di 50 µl L⁻¹. *= i valori indicano la % di embrioni con livello 0 ovvero privi di anomalie.

Trattamento	Livello di alterazione embrionale	Anomalie embrionali* (%)	ISI	Impatto ambientale
CTRL	0	89.6*	0.19	Assenza di impatto
	1	4.4		
	2	3.1		
	3	2.9		
TS	0	6.2*	2.0	Grave
	1	25.1		
	2	26.8		
	3	41.8		

5. DISCUSSIONE

Nonostante il Mar Mediterraneo ospiti quasi l'8% della biodiversità marina globale, (Coll et al., 2010), distruzione di habitat, pesca eccessiva, contaminanti, eutrofizzazione, introduzione di specie aliene e cambiamenti climatici stanno producendo cambiamenti sempre più evidenti nella struttura della comunità e nella biodiversità di questo mare (Tamburello et al., 2022).

La crescita della popolazione costiera e del turismo stanno determinando anche un aumento dell'uso di prodotti cosmetici per la protezione solare che vengono inevitabilmente rilasciati in ambiente costiero, causando danni all'ecosistema e agli organismi marini (Sundseth 2009; Sartori et al., 2017; Sureda et al., 2018).

In aggiunta, il crescente interesse delle persone per i temi ambientali ha portato un aumento esponenziale nell'ultimo decennio, della domanda da parte dei consumatori di prodotti eco-compatibili, inclusi quelli per la protezione solare.

Lo scopo di questo studio è stato valutare i potenziali effetti causati da prodotti solari su tre organismi marini appartenenti a differenti livelli della catena trofica marina.

In particolare, sono state scelti quattro prodotti solari, inclusi tre prodotti che presentavano claim "green" quali "eco-friendly, reef-safe, ocean respect, save the sea" contenenti filtri UV definiti di vecchia (i.e., l'ethylhexyl salicylate, EHS) e nuova generazione (i.e. butyl methoxydibenzoylmethane, BMDM e dietilammino idrossibenzoil esil benzoato DHHB) ed un prodotto solare caratterizzato da una formulazione innovativa in termini di filtri UV.

I prodotti per la protezione solare sono una fonte significativa di sostanze chimiche organiche e inorganiche (Corsi et al., 2014) che raggiungono il mare con potenziali conseguenze ecologiche sull'ecosistema marino costiero. Infatti, gli ecosistemi costieri del Mediterraneo sono attualmente considerati aree prioritarie per la stima del potenziale impatto ecologico dei prodotti solari (Fastelli e Renzi, 2019).

Nonostante queste evidenze, la maggior parte degli studi si focalizza sull'impatto dei prodotti solari e dei loro ingredienti sui coralli ed altri organismi del reef (Danovaro et al. 2008; Downs et al. 2016; McCoshum et al. 2016), mentre sono disponibili meno informazioni sulle specie che vivono nelle regioni temperate.

La necessità di comprendere gli effetti sugli ecosistemi marini diventa sempre più importante, in gran parte quelli a lungo termine che sono ancora in gran parte sconosciuti.

Qui, osserviamo che tutti i prodotti solari testati in questo studio alla concentrazione di 50 $\mu\text{L/L}$, inclusi quelli definiti dalle case produttrici “eco-compatibili, naturali, e ocean respect”, ad esclusione di ECO-SUN 1, causano una diminuzione del tasso di crescita delle cellule algali, con valori significativamente più basso rispetto ai sistemi di controllo al termine dell'esperimento. Già dopo 5 giorni dall'aggiunta dei prodotti solari TS, ECO SUN 2 e ECO SUN 3 si osservava una drastica diminuzione dell'abbondanza cellulare e questo pattern era ben visibile anche nei tempi successivi. In particolar modo sistemi trattati col prodotto ECO SUN 2, al quinto giorno di esposizione hanno mostrato una diminuzione dell'abbondanza cellulare rispetto al

controllo, con valori del tasso di crescita al termine dell'esperimento prossimi allo zero (0.08 cellule ml/giorno).

Questi risultati sono in linea con precedenti studi che hanno rivelato come prodotti solari, anche a basse concentrazioni (50 $\mu\text{L/L}$), causavano effetti negativi su differenti microalghe marine (Paredes et al., 2014; Tovar Sanchez et al., 2013; Gago-Ferrero et al., 2012; Sieratowicz et al., 2011; Rodil et al., 2009).

Diversi studi hanno riportato che i filtri UV organici definiti di "vecchia generazione" (i.e. ethylhexyl salicylate) a concentrazioni comprese tra 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5 mg L^{-1} possono esercitare effetti negativi su un'ampia gamma di organismi marini tra cui *P. lividus* (Fivenson et al., 2021; Giraldo et al., 2017; Lozano et al., 2020b; Paredes et al., 2014).

Thorel et al. (2020) in un recente studio ha valutato la tossicità di 10 filtri organici (di vecchia e nuova generazione) inclusi l'ethylhexyl salicylate (EHS), il butyl methoxydibenzoylmethane (BMDM) e dietilammino idrossibenzoil esil benzoato (DHHB) presenti anche nelle formulazioni solari da noi testate, sulla microalga *Tetraselmis* sp. ed il crostaceo *A. salina*. Lo studio evidenziava una tossicità di medio livello per EHS ed DHHB sull'attività metabolica dell'alga a concentrazioni in linea con il nostro studio. Inoltre l'EHS causava una diminuzione del tasso di crescita di *Tetraselmis* sp. Al contrario non si evidenziavano effetti negativi sul crostaceo *A. salina*, che invece mostrava sensibilità al BMDM, ad alte concentrazioni ma aveva scarso effetto sulle microalghe.

Similmente i risultati su *Artemia salina*, evidenziano che tutte i prodotti solari utilizzati (concentrazione finale di 50 µL/L), causano una diminuzione della percentuale di vitalità nelle larve di *A. salina* dopo 72 ore di esposizione.

In particolare risultati simili a quelli ottenuti sulla microalga *N. salina* sono stati riscontrati anche in questo modello sperimentale. Infatti i prodotti solari TS ed ECO SUN 2, causano un grave impatto su *A. salina*, in linea con quanto osservato su *N. salina*, raggiungendo rispettivamente circa il 50 e il 97 % di naupli non vitali rispetto al controllo al termine dell'esperimento. ECO SUN 3 mostra un impatto più moderato rispetto ad ECO SUN 2 e TS sui naupli di *A. salina*, analogamente a quanto osservato sulla microalga *N. salina* ed ECO SUN 1 l' impatto più lieve rispetto agli altri trattati.

I risultati ottenuti dallo studio delle anomalie morfologiche mostrano che tutti i prodotti solari inclusi quelli definiti dalle case produttrici "eco-compatibili, naturali, e ocean respect" utilizzate in questo studio, causano un aumento della percentuale di larve anomale al termine dell'esperimento, rispetto ai sistemi di controllo, similmente a quanto osservato nella percentuale di vitalità. Pertanto i prodotti solari qui testati, alterano la morfologia di *A. salina*, durante 72 ore di esposizione.

In particolar modo, i prodotti solari ECO SUN 2 e TS causano un' elevata percentuale di anomalie larvali al termine della sperimentazione rispetto al controllo e agli altri trattati, raggiungendo rispettivamente il 79 e 93% di meta-naupli anomali. Dopo 72 ore dall'aggiunta del prodotto solare ECO SUN 3, si osserva un aumento rispetto al controllo della percentuale di larve di *A. salina* anomale, con valori pari al 35% di

anomalie riscontrate, ed un livello di impatto moderato. ECO-SUN 1 invece mostra un impatto lieve al termine della sperimentazione, rispetto agli altri trattati (27 % di naupli anomali).

Le anomalie morfologiche riscontrate nelle larve di *A.salina* esposte ai differenti prodotti sono simili tra i trattati e paragonabili ad altri studi. Infatti risultati simili in termini di anomalie riscontrate si osservano con altre sostanze quali Durion (Shaala et al., 2015), metalli pesanti (Zukifli et al., 2014), il tributyltin chloride (Shaatala et al., 2015) ed altri inquinanti (Gonzales et al., 2019; Madhav al. 2017; Ozkan et al., 2016; Shaala et al., 2014).

Questo studio è condotto utilizzando naupli post-schiusa di 24 ore quindi tutte le larve dopo 48-72 ore di esposizione erano mutate agli stadi II e III. Essendo questi stadi di sviluppo più sensibili rispetto ad altri e ad individui adulti (Altinok et al., 2016; Sorgeloos et al. 1978) si utilizzano anche per valutare l'impatto di questi prodotti su primi stadi di sviluppo larvale di *A. salina*.

La maggiore sensibilità della larva alla tossicità delle creme agli stadi II e III dipende dall'apparato digerente ben sviluppato e funzionante, e dopo 48-72 ore dalla schiusa l'*Artemia* solitamente si alimenta tramite filtrazione di piccole particelle di cibo (1-50 µm, alghe e batteri) essendo un filtratore non selettivo (G. Van Stappen., 1996). Il nostro studio evidenzia la presenza di crema solare all'interno del tratto digerente delle larve di *A. salina* esposte ai differenti prodotti solari, suggerendo che le larve di *A. salina* accumulano nel tratto digerente la crema solare presente nell'acqua di mare

(Rajasree et al. 2011) con possibili conseguenze negative sia sull'organismo stesso (Madhav et al.,2017) che in organismi a livelli trofici superiori. L'accumulo di inquinanti in parte o in tutto il tratto digerente dei naupli all'Instar II e III si osserva anche in altri studi (Madhav et al., 2017).

Inoltre, al fine di approfondire e valutare maggiormente gli effetti del prodotto solare TS (caratterizzato da una formulazione in termini di filtri UV innovativi) sull'ecosistema marino costiero, è stato condotto un ulteriore esperimento di laboratorio sullo sviluppo embrionale del riccio di mare *P. lividus*.

I risultati evidenziano un grave impatto del prodotto solare sulle prime fasi di sviluppo embrionale del riccio di mare *P. lividus*. Infatti dopo 24 ore dall'aggiunta del prodotto TS il 94 % degli embrioni esposti risulta essere anomalo.

I tipi di malformazioni osservati negli embrioni di *P. lividus* esposti al prodotto solare TS si confrontano con le anomalie riscontrate in altri studi (Gambardella et al., 2021; Corinaldesi et al.,2017; Manzo et al., 2013). Le malformazioni più comuni osservate dopo 24 ore di esposizione al prodotto solare TS sono: blocco dello sviluppo a livello di gastrula, blastula o stadio iniziale, grave ritardo dello sviluppo, divisione asimmetrica in blastomeri, esogastrule e necrosi. In particolare, gli embrioni esposti a TS mostrano un'alta percentuale di malformazioni embrionali dovute alla migrazione anomala delle Cellule del Mesenchima Primario (PMC), che non riescono ad entrare nella cavità celomica e vengono estruse, formando esogastrule (Gambardella et al., 2021, anomalie di tipo 6).

Coerentemente con i nostri risultati, le stesse anomalie si osservano negli embrioni di *Strongylocentrotus purpuratus* (Cunningham et al., 2020) e di *P. lividus* (Gambardella et al., 2021; Corinaldesi et al., 2017) esposti a creme solari.

Inoltre, i gravi ritardi nello sviluppo osservati nei ricci di mare allo stadio di gastrula sembrano essere una conseguenza di bilanci energetici alterati (Gambardella et al., 2013). L'attivazione dei sistemi di difesa contro gli inquinanti comporta infatti un costo energetico per gli embrioni, che si traduce in alterazioni dello sviluppo e formazione di morfotipi alternativi (Bonaventura 2022). Si segnala che le fasi più sensibili agli inquinanti durante lo sviluppo iniziale sono il periodo tra la fecondazione e lo stadio di blastula e l'esogastrulazione può derivare dall'esposizione a determinati inquinanti in determinate fasi dello sviluppo (Mitsunaga e Yasumasu, 1984), incluse le creme solari. Pertanto, i risultati di questo studio indicano che le creme solari, incluse quelle che espongono green claim di eco-compatibilità, possono essere dannose per il fitoplancton (ad eccezione dell'ECO SUN 1) e possono compromettere gravemente le prime fasi di vita degli invertebrati marini, come indicato da risultati ottenuti su naupli di *A. salina* ed embrioni di *P. lividus*.

Sebbene siano necessari ulteriori studi su una più ampia diversità di specie, questi risultati suggeriscono che le formulazioni solari, incluse quelle con green claim, hanno effetti negativi non solo sugli organismi marini dei primi livelli della rete trofica ma possono essere potenzialmente dannose anche per gli organismi dei livelli trofici superiori.

Identificare quali degli ingredienti di un prodotto per la cura della persona sia responsabili dell'impatto negativo sugli organismi marini è un compito complesso in quanto l'effetto di ciascun ingrediente non sempre coincide con l'effetto sinergico con altri ingredienti di quel prodotto (Kudłak et al., 2022; Park et al., 2017; Varrella et al. 2022).

I prodotti solari testati in questo studio si caratterizzano per un considerevole numero di ingredienti in particolar modo filtri UV, solventi, agenti che controllano la viscosità, emollienti, emulsionanti e tensioattivi. Inoltre il differente livello di impatto dei prodotti solari testati in questo studio, potrebbe essere dovuto proprio alla diversa composizione della formulazione in termini di ingredienti e concentrazioni. Tali ingredienti potrebbero inoltre interagire tra loro determinando un effetto mixture differente a seconda dei composti, con caratteristiche diverse di dispersione nell'ambiente e con la formazione di sottoprodotti, la cui tossicità potrebbe non rispecchiare quella dei singoli ingredienti presenti nel prodotto iniziale (Botta et al., 2011; Tovar-Sanchez et al., 2019). Ad esempio Grbovic et al., (2016) evidenzia una maggior tossicità del DHHB rispetto ai suoi sottoprodotti clorurati, sulle microalghe, contrariamente a *Daphnia magna* maggiormente sensibile ai sottoprodotti del DHHB.

Le quattro formulazioni solari qui utilizzate, si caratterizzano per una composizione simile in termini di filtri UV quali ethylhexyl triazone (EHT), e bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (BEMT), comuni a tutti i prodotti testati.

Ad esempio i prodotti solari ECO-SUN 2, TS causavano i livelli di impatto più alti su tutti gli organismi marini modello testati *A. salina*, *N. salina* e *P. lividus* (per il prodotto solare TS). Questo potrebbe essere dovuto ad un numero di ingredienti molto più alto rispetto alle altre formulazioni testate, in particolar modo per ciò che concerne filtri UV, solventi e tensioattivi. La presenza di una ricca miscela di conservanti di filtri UV organici, nei prodotti TS ed ECO SUN 2 possono provocare livelli elevati di specie reattive dell'ossigeno negli organismi marini, infatti i filtri UV sotto la radiazione solare rilasciano perossido di idrogeno libero nell'acqua di mare (Canesi e Corsi, 2016; Sánchez-Quiles e Tovar-Sánchez, 2014; Silvia Díaz-Cruz et al., 2008). Inoltre, il prodotto TS è caratterizzato da un elevato numero di filtri UV nella sua formulazione (DHHB, EHS, diethylhexyl butamido triazone, ethylhexyl triazone, BEMT, BMDM), incluso un filtro innovativo di ultima generazione brevettato (MBBT + Escalol SR) esclusivo di questo prodotto, il cui effetto individuale non è ancora noto.

Diversamente da ECO-SUN 2 e TS, ECO-SUN 1 si caratterizza per un numero di ingredienti minore in termini di filtri UV e dalla presenza del drometrizole trisiloxane, un filtro organico. Pochi studi sono presenti in letteratura sulla tossicità di questo filtro. Studi recenti non evidenziano effetti negativi del drometrizole trisiloxane su coralli e i loro organismi simbiotici (Lozano et al., 2019; Fel et al., 2018).

Risulta chiaro che le informazioni riguardanti gli effetti biologici dei filtri UV definiti di nuova generazione ed il destino in mare sono scarse (Du et al., 2022). Solo di recente alcuni studi si stanno focalizzando sul possibile impatto di questi filtri sull'ecosistema

marino, data anche la crescente concentrazione (fino a mg/L) che si rileva lungo la colonna d'acqua e nel sedimento (Cadena-Aizaga et al., 2022; Du et al., 2022; Fagervold et al., 2019; Apel et al., 2018). Inoltre dai risultati ottenuti in letteratura, gli impatti sembrano variare a seconda dell'organismo utilizzato e della concentrazione testata. Ad esempio alcuni studi confermano la tossicità dell'ethylhexyl salicylate (ES) su differenti organismi marini (Zhao et al., 2023; Varrella et al., 2022; Thorel, et al., 2020), al contrario altri studi osservano una scarsa tossicità nei riguardi di *Artemia salina* e nessun effetto su coralli tropicali (Danovaro et al., 2008; Thorel et al., 2020). Similmente il DHHB sembra avere risposte differenti a seconda dell'organismo testato (Varrella et al., 2022; Thorel et al 2020; Grbovic et al., 2015). Anche il filtro solare BEMT risulta dannoso su differenti organismi marini (Cadena-Aizaga et al., 2022; Labille et al., 2020b; Fagervold et al., 2019; Mitchelmore et al., 2019) mentre non sembra avere effetti su *A. salina* e *Tetraselmis sp* (Thorel et al., 2020).

D'altra parte, non è da escludere un possibile effetto sinergico di altri composti bioattivi presenti nella formulazione solari che possono compromettere lo stato di salute degli organismi marini utilizzati e giustificare il differente livello di impatto dei prodotti solari osservato in questo studio. I prodotti definiti eco-compatibili sono prodotti che dovrebbero essere caratterizzati da un basso impatto ambientale. I prodotti naturali hanno un basso impatto ambientale (Dayan et al., 2011). Ad esempio, la caffeina è una sostanza naturale, ma diversi studi dimostrano che ha un effetto negativo sugli organismi marini (Schneider et al., 2016; Jiangn et al., 2014). Allo stesso tempo, un ingrediente cosmetico definito eco-compatibile o naturale deve essere testato su

differenti organismi marini, prima di essere definito tale. Purtroppo, non esistono studi che valutano l'effetto di questi prodotti, definiti “naturali”, sugli organismi marini. La presente ricerca è il primo studio che si occupa di valutare il potenziale impatto di creme solari contenenti ingredienti naturali e definite a basso impatto ambientale su *A. salina*, *N. salina*, e *P. lividus*.

6. CONCLUSIONI

Tra tutti i prodotti per la protezione solare testati, incluse creme solari con claim di eco-compatibilità, tutti risultano dannosi per gli organismi oggetto di studio. Dal momento che tali prodotti non appaiono essere testati in modo specifico per la loro eco-compatibilità, la maggior parte delle dichiarazioni riportate sulle confezioni si basa su presupposti (e.g., presenza o meno di ingredienti specifici con impatto ecologico noto, biodegradabilità del loro packaging).

I risultati di questo studio suggeriscono che le creme solari testate risultano dannose per il fitoplancton e possono compromettere gravemente le prime fasi di vita degli invertebrati marini, come indicato da risultati ottenuti su naupli di *A. salina* ed embrioni di *P. lividus*. Il potenziale accumulo delle creme solari nelle larve di *A. salina* suggerisce inoltre un trasferimento di questi contaminanti lungo la rete trofica, lasciando ipotizzare anche effetti negativi sulla salute umana.

Nel complesso, i risultati qui presentati evidenziano l'importanza di testare l'intera formulazione dei prodotti solari piuttosto che la sola presenza di specifici filtri UV per

accertare l'ecocompatibilità dei filtri solari e che la semplice sostituzione di uno o più filtri UV o ingredienti di nota tossicità (come sempre più osservato in vari marchi di creme solari) non giustifica il claim “eco-friendly” di un prodotto per la cura della persona.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Agnetta, D., Badalamenti, F., Ceccherelli, G., Di Trapani, F., Bonaviri, C., & Gianguzza, P. (2015). Role of two co-occurring Mediterranean Sea urchins in the formation of barren from *Cystoseira* canopy. *Estuarine, coastal and shelf science*, 152, 73-77.
2. Altinok, I., Ilhan, H., Ozkan, Y., & Sokmen, M. (2016). Determination of TiO₂ and AgTiO₂ Nanoparticles in *Artemia salina*: Toxicity, Morphological Changes, Uptake and Depuration
3. Apel, C., Tang, J., & Ebinghaus, R. (2018). Environmental occurrence and distribution of organic UV stabilizers and UV filters in the sediment of Chinese Bohai and Yellow Seas. *Environmental Pollution*, 235, 85-94.
4. Astel, A., Stec, M., & Rykowska, I. (2020). Occurrence and distribution of UV filters in beach sediments of the southern baltic sea coast. *Water*, 12(11), 3024.
5. Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M. R., & Bottero, J. Y. (2009). Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution*, 157(4), 1127-1133.
6. Bargar, T. A., Alvarez, D. A., & Garrison, V. H. (2015). Synthetic ultraviolet light filtering chemical contamination of coastal waters of Virgin Islands national park, St. John, US Virgin Islands. *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 193-199

7. Barone, A. N., Hayes, C. E., Kerr, J. J., Lee, R. C., & Flaherty, D. B. (2019). Acute toxicity testing of TiO₂-based vs. oxybenzone-based sunscreens on clownfish (*Amphiprion ocellaris*). *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 14513-14520.
8. Beirne, N., Edmundson, S., Gao, S., Freeman, J., & Huesemann, M. (2023). A streamlined approach to characterize microalgae strains for biomass productivity under dynamic climate simulation conditions. *Algal Research*, 72, 103099.
9. Benedetti-Cecchi, L., Pannacciulli, F., Bulleri, F., Moschella, P. S., Airoidi, L., Relini, G., & Cinelli, F. (2001). Predicting the consequences of anthropogenic disturbance: large-scale effects of loss of canopy algae on rocky shores. *Marine Ecology Progress Series*, 214, 137-150.
10. Bethoux, J. P., El Boukhary, M. S., Ruiz-Pino, D., Morin, P., & Copin-Montégut, C. (2005). Nutrient, Oxygen and Carbon Ratios, CO₂ Sequestration and Anthropogenic Forcing in the Mediterranean Sea. *The Mediterranean Sea*, 67-86.
11. Bilal, M., Mehmood, S., & Iqbal, H. M. (2020). The beast of beauty: environmental and health concerns of toxic components in cosmetics. *Cosmetics*, 7(1), 13.

12. Bindoff, N. L., Cheung, W.W.L., Kairo, J.G., Arístegui, J., Guinder, V.A., Hallberg, R., Hilmi, N., Jiao, N., Karim, M.S., Levin, L., O'Donoghue, S., Purca-Cuicapusa, R.S., Rinkevich, B., Suga, T., Tagliabue, A., & Williamson, P. (2019). Changing ocean, marine ecosystems, and dependent communities.
13. Blaise, C., Gagné, F., Ferard, J. F., & Eullaffroy, P. (2008). Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 23(5), 591-598.
14. Bom, S., Jorge, J., Ribeiro, H. M., & Marto, J. O. A. N. A. (2019). A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *Journal of Cleaner Production*, 225, 270-290.
15. Bonaventura, R., Costa, C., Deidda, I., Zito, F., & Russo, R. (2022). Gene expression analysis of the stress response to lithium, nickel, and zinc in *Paracentrotus lividus* embryos. *Toxics*, 10(6), 325.
16. Botta, C., Labille, J., Auffan, M., Borschneck, D., Miche, H., Cabié, M., Masion, A., Rose, J., & Bottero, J. Y. (2011). TiO₂-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: Structures and quantities. *Environmental Pollution*, 159(6), 1543-1550.
17. Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2020). *Paracentrotus lividus*. *Developments in aquaculture and fisheries science*, 43, 447-485.

18. Brock, T. C., Arts, G. H., Maltby, L., & Van den Brink, P. J. (2006). Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals, and common aims in European Union legislation. *Integrated Environmental Assessment and Management: An International Journal*, 2(4), e20-e46.
19. Bustos-Obregon, E., & Vargas, Á. (2010). Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. *Biological research*, 43(3), 357-362
20. Cadena-Aizaga, M. I., Montesdeoca-Esponda, S., Torres-Padrón, M. E., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2020). Organic UV filters in marine environments: An update of analytical methodologies, occurrence and distribution. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 25, e00079.
21. Cadena-Aizaga, M. I., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2022). Occurrence and environmental hazard of organic UV filters in seawater and wastewater from Gran Canaria Island (Canary Islands, Spain). *Environmental Pollution*, 300, 118843.
22. Caloni, S., Durazzano, T., Franci, G., & Marsili, L. (2021). Sunscreens' UV Filters Risk for Coastal Marine Environment Biodiversity: A Review. *Diversity*, 13(8), 374.
23. Canesi, L., & Corsi, I. (2016). Effects of nanomaterials on marine invertebrates. *Science of the total environment*, 565, 933-940.

24. Carballeira, C., Ramos-Gómez, J., Martín-Díaz, L., & DelValls, T. A. (2012). Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: application to marine pisciculture effluents. *Marine Environmental Research*, 77, 12-22.
25. Carp, O., Huisman, C. L., & Reller, A. (2004). Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in solid state chemistry*, 32(1-2), 33-177.
26. Casas-Beltrán, D. A., Febles-Moreno, K., Hernandez-Yac, E., Gallaher, C. M., Alvarado-Flores, J., Leal-Bautista, R. M., & Lenczewski, M. (2021). Impact of tourist behavior on the discharge of sunscreen contamination in aquatic parks, sinkholes, and beaches of the Mexican Caribbean. *applied sciences*, 11(15), 6882.
27. Chatzigianni, M., Pavlou, P., Siamidi, A., Vlachou, M., Varvaresou, A., & Papageorgiou, S. (2022). Environmental impacts due to the use of sunscreen products: a mini-review. *Ecotoxicology*, 31(9), 1331-1345.
28. Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Ben Rais Lasram, F., Aguzzi, J., ... & Voultsiadou, E. (2010). The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns, and threats. *PloS one*, 5(8), e11842.
29. Costello, M. J., Bouchet, P., Emblow, C. S., & Legakis, A. (2006). European marine biodiversity inventory and taxonomic resources: state of the art and gaps in knowledge. *Marine Ecology Progress Series*, 316, 257-268.

30. Corinaldesi, C., Damiani, E., Marcellini, F., Falugi, C., Tiano, L., Brugè, F., & Danovaro, R. (2017). Sunscreen products impair the early developmental stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Scientific reports*, 7(1), 7815.
31. Corinaldesi, C., Marcellini, F., Nepote, E., Damiani, E., & Danovaro, R. (2018). Impact of inorganic UV filters contained in sunscreen products on tropical stony corals (*Acropora spp.*). *Science of The Total Environment*, 637, 1279-1285.
32. Corsi, I., Cherr, G. N., Lenihan, H. S., Labille, J., Hasselov, M., Canesi, L., Dondero, F., Frenzilli, G., Hristozov, D., Pantes, V., Della Torre, C., Pinsino, A., Libralato, G., Marcomini, A., Sabbioni, E. & Matranga, V. (2014). Common strategies and technologies for the ecosafety assessment and design of nanomaterials entering the marine environment. *ACS nano*, 8(10), 9694-9709.
33. Cunningham, B., Torres-Duarte, C., Cherr, G., & Adams, N. (2020). Effects of three zinc-containing sunscreens on development of purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 218, 105355.
34. Danovaro, R., & Corinaldesi, C. (2003). Sunscreen products increase virus production through prophage induction in marine bacterioplankton. *Microbial ecology*, 45, 109-118.
35. Danovaro, R., & Pusceddu, A. (2007). Ecomanagement of biodiversity and ecosystem functioning in the Mediterranean Sea: concerns and strategies. *Chemistry and Ecology*, 23(5), 347-360. 5 (2007): 347-360.

36. Danovaro, R., Bongiorni, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., Greci, [L.](#), & Pusceddu, A. (2008). Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental health perspectives*, 116(4), 441-447.
37. DAYAN, N., & KROMIDAS, L. (2011). Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products.
38. Díaz-Cruz, M. S., Llorca, M., & Barceló, D. (2008). Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(10), 873-887.
39. Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2009). Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 708-717.
40. Downs, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., Ciner, F. R., Jeger, R., Lichtenfeld, Y., Woodley, C.M., Pennington, P. ., Cadenas, [K.](#), Kushmaro, A. ., & Loya, Y. (2016). Toxicopathological effects of the sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the US Virgin Islands. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 70, 265-288.

41. Du, B., He, Y., Liang, B., Li, J., Luo, D., Chen, H., ... & Zeng, L. (2022). Identification of triazine UV filters as an emerging class of abundant, ubiquitous pollutants in indoor dust and air from South China: call for more concerns on their occurrence and human exposure. *Environmental Science & Technology*, *56*(7), 4210-4220
42. Emig, C., & Geistdoerfer, P. (2005). The Mediterranean deep-sea fauna: historical evolution, bathymetric variations and geographical changes. *arXiv preprint q-bio/0507003*.
43. Fagervold, S. K., Rodrigues, A. S., Rohée, C., Roe, R., Bourrain, M., Stien, D., & Lebaron, P. (2019). Occurrence and environmental distribution of 5 UV filters during the summer season in different water bodies. *Water, Air, & Soil Pollution*, *230*, 1-13.
44. Falugi, C., Lammerding-Koppel, M., & Aluigi, M. G. (2008). Sea urchin development: an alternative model for mechanistic understanding of neurodevelopment and neurotoxicity. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *84*(3), 188-203.
45. Fastelli, P., & Renzi, M. (2019). Exposure of key marine species to sunscreens: Changing ecotoxicity as a possible indirect effect of global warming. *Marine pollution bulletin*, *149*, 110517.

46. Fel, J. P., Lacherez, C., Bensetra, A., Mezzache, S., Béraud, E., Léonard, M., ... & Ferrier-Pagès, C. (2019). Photochemical response of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* to some sunscreen ingredients. *Coral Reefs*, 38, 109-122.
47. Fent, K., Zenker, A., & Rapp, M. (2010). Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental Pollution*, 158(5), 1817-1824.
48. Fent, K., Chew, G., Li, J., Gomez, E. (2014). Benzotriazole UV-stabilizers and benzotriazole: Antiandrogenic activity in vitro and activation of aryl hydrocarbon receptor pathway in zebrafish eleuthero-embryos. *Science of the Total Environment*, 482, 125-136.
49. Fivenson, D., Sabzevari, N., Qiblawi, S., Blitz, J., Norton, B. B., & Norton, S. A. (2021). Sunscreens: UV filters to protect us: Part 2-Increasing awareness of UV filters and their potential toxicities to us and our environment. *International Journal of Women's Dermatology*, 7(1), 45-69.
50. Gago-Ferrero, P., Diaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2012). An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 2597-2610.
51. Gambardella, C., Marcellini, F., Falugi, C., Varrella, S., & Corinaldesi, C. (2021). Early-stage anomalies in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: Overview and future perspectives. *Environmental Pollution*, 287, 117608.

52. Geng, H., Tran-Gyamfi, M. B., Lane, T. W., Sale, K. L., & Yu, E. T. (2016). Changes in the structure of the microbial community associated with *Nannochloropsis salina* following treatments with antibiotics and bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1155.
53. Gennaro, P., Piazzzi, L., Cecchi, E., Montefalcone, M., Morri, C., Bianchi, C. N. (2020). Monitoraggio e valutazione dello stato ecologico dell'habitat a coralligeno. *Il coralligeno di parete. ISPRA, Manuali e Linee Guida*, (191).
54. Giokas, D. L., Salvador, A., & Chisvert, A. (2007). UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 360-374.
55. Giraldo, A., Montes, R., Rodil, R., Quintana, J. B., Vidal-Liñán, L., & Beiras, R. (2017). Ecotoxicological evaluation of the UV filters ethylhexyl dimethyl p-aminobenzoic acid and octocrylene using marine organisms *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis* and *Paracentrotus lividus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 606-611.
56. Grbović, G., Malev, O., Dolenc, D., Klobučar, R. S., Cvetković, Ž., Cvetković, B., ... & Trebše, P. (2015). Synthesis, characterisation and aquatic ecotoxicity of the UV filter hexyl 2-(4-diethylamino-2-hydroxybenzoyl) benzoate (DHHB) and its chlorinated by-products. *Environmental chemistry*, 13(1), 119-126.
57. Grech, D. (2017). Historical records and current status of Fucales (*Cystoseira* and *Sargassum* spp.) in the Gulf of Naples.

58. Groz, M. P., Bueno, M. M., Rosain, D., Fenet, H., Casellas, C., Pereira, C., Maria, V., Bebianno M.J., & Gomez, E. (2014). Detection of emerging contaminants (UV filters, UV stabilizers and musks) in marine mussels from Portuguese coast by QuEChERS extraction and GC–MS/MS. *Science of the total environment*, 493, 162-169.
59. Haynes, V. N., Ward, J. E., Russell, B. J., & Agrios, A. G. (2017). Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms—Current knowledge and suggestions for future research. *Aquatic Toxicology*, 185, 138-148.
60. Hazeem, L. J., Bououdina, M., Rashdan, S., Brunet, L., Slomianny, C., & Boukherroub, R. (2016). Cumulative effect of zinc oxide and titanium oxide nanoparticles on growth and chlorophyll a content of *Picochlorum* sp. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 2821-2830.
61. He, T., Tsui, M. M. P., Tan, C. J., Ma, C. Y., Yiu, S. K. F., Wang, L. H., ... & Murphy, M. B. (2019). Toxicological effects of two organic ultraviolet filters and a related commercial sunscreen product in adult corals. *Environmental Pollution*, 245, 462-471.
62. Jiang, J. J., Lee, C. L., & Fang, M. D. (2014). Emerging organic contaminants in coastal waters: Anthropogenic impact, environmental release and ecological risk. *Marine pollution bulletin*, 85(2), 391-399.

63. Kim, J. W., Isobe, T., Ramaswamy, B. R., Chang, K. H., Amano, A., Miller, T. M., Siringan, F.P. ., & Tanabe, S. (2011). Contamination and bioaccumulation of benzotriazole ultraviolet stabilizers in fish from Manila Bay, the Philippines using an ultra-fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, *85*(5), 751-758.
64. Kim, J. W., Chang, K. H., Isobe, T., & Tanabe, S. (2011a). Acute toxicity of benzotriazole ultraviolet stabilizers on freshwater crustacean (*Daphnia pulex*). *The Journal of toxicological sciences*, *36*(2), 247-251.
65. Kim, S., & Choi, K. (2014). Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. *Environment international*, *70*, 143-157.
66. Kudłak, B., Jatkowska, N., Liu, W., Williams, M. J., Barcelo, D., & Schiöth, H. B. (2022). Enhanced toxicity of bisphenols together with UV filters in water: identification of synergy and antagonism in three-component mixtures. *Molecules*, *27*(10), 3260.
67. Kunz, P. Y., & Fent, K. (2006). Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology*, *79*(4), 305-324.
68. La Farre, M., Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *27*(11), 991-1007.

69. Labille, J., Catalano, R., Slomberg, D., Motellier, S., Pinsino, A., Hennebert, P., ... & Bartolomei, V. (2020). Assessing sunscreen lifecycle to minimize environmental risk posed by nanoparticulate UV-filters—a review for safer-by-design products. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 101.
70. Labille, J., Catalano, R., Slomberg, D., Motellier, S., Pinsino, A., Hennebert, P., ... & Bartolomei, V. (2020b). Corrigendum: Assessing Sunscreen Lifecycle to Minimize Environmental Risk Posed by Nanoparticulate UV-Filters—A Review for Safer-by-Design Products. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 597861.
71. Langford, K. H., & Thomas, K. V. (2008). Inputs of chemicals from recreational activities into the Norwegian coastal zone. *Journal of Environmental Monitoring*, 10(7), 894-898.
72. Lenormand, T., Nougé, O., Jabbour-Zahab, R., Arnaud, F., Dezileau, L., Chevin, L. M., & Sánchez, M. I. (2018). Resurrection ecology in *Artemia*. *Evolutionary applications*, 11(1), 76-87.
73. Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological indicators*, 69, 35-49.
74. Lozano, C., Givens, J., Stien, D., Matallana-Surget, S., & Lebaron, P. (2020). Bioaccumulation and toxicological effects of UV-filters on marine species. Sunscreens in coastal ecosystems: Occurrence, behavior, effect and risk, 85-130.

75. Lucas, J., Logeux, V., Rodrigues, A. M., Stien, D., & Lebaron, P. (2021). Exposure to four chemical UV filters through contaminated sediment: Impact on survival, hatching success, cardiac frequency, and aerobic metabolic scope in embryo-larval stage of zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 29412-29420.
76. Madhav, M. R., David, S. E. M., Kumar, R. S., Swathy, J. S., Bhuvaneshwari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2017). Toxicity and accumulation of Copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *Artemia salina*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 52, 227-238.
77. Maipas, S., & Nicolopoulou-Stamati, P. (2015). Sun lotion chemicals as endocrine disruptors. *Hormones*, 14(1), 32-46.
78. Manzo, S., Miglietta, M. L., Rametta, G., Buono, S., & Di Francia, G. (2013). Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of hazardous materials*, 254, 1-9.
79. McCoshum, S. M., Schlarb, A. M., & Baum, K. A. (2016). Direct and indirect effects of sunscreen exposure for reef biota. *Hydrobiologia*, 776, 139-146.
80. Miller, R. J., Lenihan, H. S., Muller, E. B., Tseng, N., Hanna, S. K., & Keller, A. A. (2010). Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environmental science & technology*, 44(19), 7329-7334.

81. Miller, R. J., Bennett, S., Keller, A. A., Pease, S., & Lenihan, H. S. (2012). TiO₂ nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton. *PloS one*, 7(1), e30321.
82. Miller, I. B., Pawlowski, S., Kellermann, M. Y., Petersen-Thiery, M., Moeller, M., Nietzer, S., & Schupp, P. J. (2021). Toxic effects of UV filters from sunscreens on coral reefs revisited: regulatory aspects for “reef safe” products. *Environmental Sciences Europe*, 33(1), 1-13.
83. Mitchelmore, C. L., He, K., Gonsior, M., Hain, E., Heyes, A., Clark, C., Younger, R., Schmitt-Kopplin P., Feerick, A., Conway, A. & Blaney, L. (2019). Occurrence and distribution of UV-filters and other anthropogenic contaminants in coastal surface water, sediment, and coral tissue from Hawaii. *Science of the Total Environment*, 670, 398-410.
84. Mitsunaga, K., & Yasumasu, I. (1984). Stage Specific Effects of Zn²⁺ on Sea Urchin Embryogenesis (animalization/EDDA/EDTA-OH/sea urchin embryos/Zn²⁺). *Development, growth & differentiation*, 26(4), 317-327.
85. Osterwalder, U., Sohn, M., & Herzog, B. (2014). Global state of sunscreens. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 30 (2-3), 62-80.
86. Ozkan, Y., Altinok, I., Ilhan, H., & Sokmen, M. (2016). Determination of TiO₂ and AgTiO₂ nanoparticles in *Artemia salina*: toxicity, morphological changes, uptake and depuration. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 96, 36-42.

87. Paredes, E., Pérez, S., Rodil, R., Quintana, J. B., & Beiras, R. (2014). Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. *Chemosphere*, 104, 44-50.
88. Park, C. B., Jang, J., Kim, S., & Kim, Y. J. (2017). Single-and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzene on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 137, 57-63.
89. Peng, X., Palma, S., Fisher, N. S., & Wong, S. S. (2011). Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquatic Toxicology*, 102(3-4), 186-196.
90. Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., & Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of nanoparticle research*, 14, 1-11.
91. Pires, A., Almeida, Â., Calisto, V., Schneider, R. J., Esteves, V. I., Wrona, F. J., ... & Freitas, R. (2016). Long-term exposure of polychaetes to caffeine: Biochemical alterations induced in *Diopatra neapolitana* and *Arenicola marina*. *Environmental Pollution*, 214, 456-463.

92. Piroddi, C., Colloca, F., & Tsikliras, A. C. (2020). The living marine resources in the Mediterranean Sea large marine ecosystem. *Environmental Development*, *36*, 100555.
93. Raffa, R. B., Pergolizzi Jr, J. V., Taylor Jr, R., Kitzen, J. M., & NEMA Research Group. (2019). Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, *44*(1), 134-139.
94. Rajasree, S. R., Kumar, V. G., Abraham, L. S., & Manoharan, N. (2011). Assessment on the toxicity of engineered nanoparticles on the lifestages of marine aquatic invertebrate *Artemia salina*. *International Journal of NanoScience*, *10*(04n05), 1153-1159.
95. Rodil, R., Moeder, M., Altenburger, R., & Schmitt-Jansen, M. (2009). Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *395*, 1513-1524.
96. Rodríguez-Romero, A., Ruiz-Gutiérrez, G., Viguri, J. R., & Tovar-Sánchez, A. (2019). Sunscreens as a new source of metals and nutrients to coastal waters. *Environmental science & technology*, *53*(17), 10177-10187.
97. Safafar, H., Hass, M. Z., Møller, P., Holdt, S. L., & Jacobsen, C. (2016). High-EPA biomass from *Nannochloropsis salina* cultivated in a flat-panel photobioreactor on a process water-enriched growth medium. *Marine drugs*, *14*(8), 144.

98. Sánchez-Quiles, D., & Tovar-Sánchez, A. (2014). Sunscreens as a source of hydrogen peroxide production in coastal waters. *Environmental science & technology*, 48(16), 9037-9042.
99. Sánchez-Quiles, D., & Tovar-Sánchez, A. (2015). Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism?. *Environment international*, 83, 158-170.
100. Santos, A. J. M., Miranda, M. S., & da Silva, J. C. E. (2012). The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water research*, 46(10), 3167-3176.
101. Sartori, D., Macchia, S., Vitiello, V., Morroni, L., Onorati, F., & Pellegrini, D. (2017). ISPRA, Quaderni–Ricerca Marina n. 11/2017. A cura di Macchia S., Sartori D., Roma, 60.
102. Scheele, A., Sutter, K., Karatum, O., Danley-Thomson, A. A., & Redfern, L. K. (2023). Environmental impacts of the ultraviolet filter oxybenzone. *Science of The Total Environment*, 863, 160966.
103. Schiaparelli, S., Castellano, M., Povero, P., Sartoni, G., & Cattaneo-Vietti, R. (2007). A benthic mucilage event in North-Western Mediterranean Sea and its possible relationships with the summer 2003 European heatwave: short term effects on littoral rocky assemblages. *Marine Ecology*, 28(3), 341-353.

104. Shaala, N. M. A., Zulkifli, S. Z., Ismail, A., Azmai, M. N. A., & Mohamat-Yusuff, F. (2015). Lethal concentration 50 (LC50) and effects of Diuron on morphology of brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) Nauplii. *Procedia Environmental Sciences*, 30, 279-284.
105. Shaala, N. M. A., Zulkifli, S. Z., Ismail, A., Azmai, M. N. A., & Mohamat-Yusuff, F. (2015). Selected morphological changes in nauplii of brine shrimp (*Artemia salina*) after tributyltin chloride (TBTCI) exposure. *World Applied Sciences Journal*, 33(8), 1334-1340.
106. Sieratowicz, A., Kaiser, D., Behr, M., Oetken, M., & Oehlmann, J. (2011). Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 46(12), 1311-1319.
107. Sobek, A., Bejgarn, S., Rudén, C., Molander, L., & Breitholtz, M. (2013). In the shadow of the Cosmetic Directive—Inconsistencies in EU environmental hazard classification requirements for UV-filters. *Science of the total environment*, 461, 706-711.
108. Soltanian, S. (2007). Protection of gnotobiotic *Artemia* against *Vibrio campbellii* using baker's yeast strains and extracts.
109. Sorgeloos, P., Rémiche-Van Der Wielen, C., & PERsooNE, G. (1978). The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests—a critical analysis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2(3-4), 249-255.

110. Sorgeloos, P., & Kulasekarapandian, S. (1984). Production and use of *Artemia* in aquaculture. *CMFRI special publication*, 15, 1-73.
111. Sureda, A., Capó, X., Busquets-Cortés, C., Tejada, S. (2018). Acute exposure to sunscreen containing titanium induces an adaptive response and oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 149, 58-63.
112. Sundseth, K. (2007). Natura 2000 in the Macaronesian region. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas.
113. Tamburello, L., Ravaglioli, C., Mori, G., Nuccio, C., & Bulleri, F. (2019). Enhanced nutrient loading and herbivory do not depress the resilience of subtidal canopy forests in Mediterranean oligotrophic waters. *Marine environmental research*, 149, 7-17.
114. Tamburello, L., Chiarore, A., Fabbriizzi, E., Colletti, A., Franzitta, G., Grech, D., Rindi, F., Frascchetti, Rizzo, L., Savinelli, B., & Frascchetti, S. (2022). Can we preserve and restore overlooked macroalgal forests? *Science of the Total Environment*, 806, 150855.
115. Tashiro, Y., & Kameda, Y. (2013). Concentration of organic sun-blocking agents in seawater of beaches and coral reefs of Okinawa Island, Japan. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 333-340.

116. Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., Basterretxea, G., Benedé, J. L., Chisvert, A., Salvador, A., ... & Blasco, J. (2013). Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters. *PLoS One*, 8(6), e65451.
117. Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., Rodríguez-Romero, A. (2019). Massive coastal tourism influx to the Mediterranean Sea: The environmental risk of sunscreens. *Science of the Total Environment*, 656, 316-321.
118. Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., Blasco, J. (2020). Sunscreens in Coastal Ecosystems. *The Handbook of Environmental Chemistry; Springer International Publishing: Cham, Switzerland*, 94.
119. Tsui, M.M P., Leung, H. W., Wai, T. C., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., Lam, P.K.S., & Murphy, M. B. (2014). Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water research*, 67, 55-65.
120. Tsui, M. M., Leung, H. W., Kwan, B. K., Ng, K. Y., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, P. K.S. ., & Murphy, M. B. (2015). Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in marine sediments in Hong Kong and Japan. *Journal of hazardous materials*, 292, 180-187.
121. Thorel, E., Clergeaud, F., Jaugeon, L., Rodrigues, A. M., Lucas, J., Stien, D., & Lebaron, P. (2020). Effect of 10 UV Filters on the Brine Shrimp *Artemia salina* and the Marine Microalga *Tetraselmis sp.* *Toxics*, 8(2), 29.

122. Van Stappen, G. (1996). 4.1. Introduction, biology and ecology of *Artemia*. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*.
123. Varrella, S., Danovaro, R., & Corinaldesi, C. (2022). Assessing the eco-compatibility of new generation sunscreen products through a combined microscopic-molecular approach. *Environmental Pollution*, *314*, 120212.
124. Watkins, Y. S., & Sallach, J. B. (2021). Investigating the exposure and impact of chemical UV filters on coral reef ecosystems: Review and research gap prioritization. *Integrated Environmental Assessment and Management*, *17*(5), 967-981.
125. Yuan, S., Huang, J., Jiang, X., Huang, Y., Zhu, X., & Cai, Z. (2022). Environmental fate and toxicity of sunscreen-derived inorganic ultraviolet filters in aquatic environments: A review. *Nanomaterials*, *12*(4), 699.
126. Zachariadis, G. A., & Sahanidou, E. (2009). Multi-element method for determination of trace elements in sunscreens by ICP-AES. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *50*(3), 342-348.
127. Zhao, G., Gao, M., Guo, S., Zeng, S., Ye, C., Wang, M., ... & Hong, Y. (2023). UV filter ethylhexyl salicylate affects cardiovascular development by disrupting lipid metabolism in zebrafish embryos. *Science of The Total Environment*, *888*, 164073.

128. Zmozinski, A. V., Pretto, T., Borges, A. R., Duarte, Á. T., & Vale, M. G. R. (2016). Determination of Pb and Cr in sunscreen samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct analysis. *Microchemical Journal*, 128, 89-94.
129. Zulkifli, S. Z., Aziz, F. Z. A., Ajis, S. Z. M., & Ismail, A. (2014). Nauplii of brine shrimp (*Artemia salina*) as a potential toxicity testing organism for heavy metals contamination. In *From Sources to Solution: Proceedings of the International Conference on Environmental Forensics 2013* (pp. 233-237). Springer Singapore.

8. SITOGRAFIA

1. <https://cdn.unenvironment.org/unepmap/unepmap/content%20pages%20images/factsheets/biodiversity.jpg>
2. <https://www.ipcc.ch/srocc/chapter/chapter-5/>
3. https://www.researchgate.net/publication/342131957_Monitoraggio_e_valutazione_dello_stato_ecologico_dell%27habitat_a_coralligeno_Il_coralligeno_di_parete.
4. https://www.vichy.it/capitalsoleil/gamma/r3104.aspx?gad=1&gclid=Cj0KCQjw3a2iBhCFARIsAD4jQB2zAW-yTUAn7N1vaRWpHP69PgXJ9pyS09cj9gZO53HV7SrH_qEgiDoaAlO-EALw_wcB&gclsrc=aw.ds
5. <https://www.avene.it/p/intense-protect-spf-50-3282770141214-30bef97c>
6. <https://www.efarma.com/svr-sun-secure-crema-solare-spf-50-viso-50-ml.html>
7. <https://rilastil.com/it/prodotto/crema-50/>
8. <https://www.fao.org/3/w3732e/w3732e0m.htm>

