



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale  
BIOLOGIA MARINA**

---

**IMPATTI DELLE CREME SOLARI SULLO SVILUPPO EMBRIONALE,  
LARVALE E SULL'ESPRESSIONE GENICA DI *PARACENTROTUS  
LIVIDUS***

**IMPACTS OF SUNSCREENS ON EMBRYO, LARVAL DEVELOPMENT  
AND GENE EXPRESSION OF *PARACENTROTUS LIVIDUS***

Candidata:

Silvia Lamanna

Relatrice:

Prof.ssa Cinzia Corinaldesi

Correlatore:

Dott. Stefano Varrella

**Sessione Straordinaria**

**Anno Accademico 2020/2021**

*A chi mi ha accompagnata in questo percorso.*

*Alla mia famiglia.*

*A me.*

*Per aspera ad astra.*

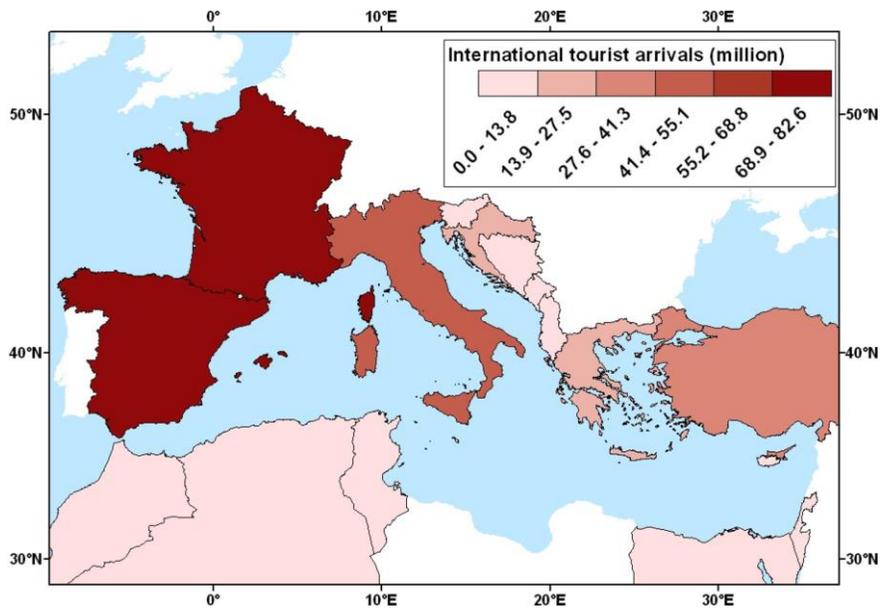
## INDICE

<b>1. Introduzione</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Impatto del turismo acquatico sugli ecosistemi marini</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Creme solari come inquinanti emergenti</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Paracentrotus lividus: importanza nell'ecosistema costiero e utilizzo come organismo modello negli studi ecotossicologici</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Obiettivi</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Creme solari considerate</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Raccolta dei gameti, coltura degli embrioni, incubazioni con le creme solari</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3 Set-Up Sperimentale</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4 Analisi morfologica di uova e larve</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5 Indice di impatto delle creme solari (ISI)</b> .....	<b>25</b>
<b>3.6 Estrazione di RNA e sintesi di cDNA</b> .....	<b>26</b>
<b>3.7 Identificazione dei geni e ottimizzazione della PCR per analisi di espressione genica</b> .	<b>27</b>
<b>3.8 Analisi dell'espressione dei geni tramite Real-Time PCR</b> .....	<b>30</b>
<b>3.9 Analisi statistiche</b> .....	<b>32</b>
<b>4. Risultati</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1 Analisi morfologica degli effetti delle creme solari sullo sviluppo embrionale del riccio di mare P. lividus</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2 Index of sunscreen impact (ISI)</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3 Variazione dell'espressione genica nelle larve di P. lividus in risposta al trattamento con le creme solari</b> .....	<b>59</b>
<b>5. Discussione</b> .....	<b>63</b>
<b>6. Conclusioni</b> .....	<b>71</b>
<b>Appendice</b> .....	<b>72</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>81</b>

# 1. Introduzione

## *1.1 Impatto del turismo acquatico sugli ecosistemi marini*

Durante l'ultimo decennio, il turismo ha avuto una crescita massiva ed è tra i settori economici destinati a registrare in futuro un maggior sviluppo. È stato stimato che entro il 2035, il tasso di turismo globale aumenterà del 179% (UNEP, 2020). La ricchezza culturale e la bellezza unica delle zone costiere hanno reso il Mar Mediterraneo la meta preferita di molti turisti europei e stranieri (Fig. 1.1), infatti, già nel 2017, attirava oltre 267 milioni di turisti (Tovar-Sánchez, Sánchez-Quiles & Blasco, 2020; Caloni et al., 2021), la maggior parte dei quali concentrata nella stagione estiva (Tovar-Sánchez et al., 2019). Nonostante il notevole 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).



**Fig. 1.1:** Presenza di turisti internazionali nei paesi che si affacciano sul Mar Mediterraneo tra il 2015-2016 (World Tourism Organization (UNWTO), 2017; Tovar-Sánchez & Sánchez-Quiles, 2019).

La presenza di creme solari negli ecosistemi costieri può dipendere da diversi fattori, tra cui il numero totale di turisti in una regione, i regolamenti imposti dai siti turistici e la legislazione ambientale che ne regola l'utilizzo (Casas-Beltrán et al., 2021). Secondo quanto suggerito dalla *Food and Drug Administration* (FDA), ogni individuo applica in media circa 2 mg/cm<sup>2</sup> di crema solare su una superficie corporea di 1 m<sup>2</sup>, stimando un consumo medio di 20 g di prodotto per applicazione (Poiger et al, 2004). Sulla base di questi dati, uno studio condotto in diverse aree di mari e oceani del mondo, ha evidenziato che il rilascio di creme solari corrisponde a circa 10.000 tonnellate ogni anno, con in media il 25% (pari a 5g) degli ingredienti rilasciati in acqua nel corso di un'immersione di 20 minuti, per un totale che va dalle 4000 alle 6000 ton/anno solo nelle aree contenenti barriere coralline (Danovaro et al., 2008). Un recente studio condotto in Francia, utilizzando un campione di 3000 bagnanti che ha applicato in media 52.5 kg di crema solare al giorno, ha evidenziato un rilascio in mare di circa 15.7 kg di crema (Labille et al., 2020). Sulla base di queste stime è possibile ipotizzare la quantità di creme solari rilasciata giornalmente dai turisti del Mediterraneo, presumendo che ognuno utilizzi la medesima quantità media: tenendo presente che, secondo Labille et al. (2020), l'applicazione media giornaliera per persona è di 17.5 g su una superficie corporea di 1 m<sup>2</sup>, il totale di crema rilasciata in mare da 267 milioni di turisti corrisponde a 1400

ton/giorno lungo le coste del Mediterraneo (rilascio medio per persona del 30%, pari a 5.2 g).

Il rilascio di ingredienti contenuti nelle creme solari negli ambienti marini può inoltre essere causato non solo dal nuoto e dalla balneazione (sorgenti non puntiformi), ma anche da scarichi industriali e dagli impianti di trattamento delle acque reflue (WWTP; sorgenti puntiformi; Daughton et al., 1999; Giokas et al., 2007). Nei 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). I filtri UV organici, contenuti nelle creme sono tipicamente considerati composti pseudo-persistenti (Tsui et al., 2015) in quanto sono in grado di permanere nell'ambiente marino per decenni (Maipas & Nicolopoulou-Stamati, 2015; Watkins & Sallach, 2021). Il loro uso è così diffuso che sono comunemente ritrovati non solo in acque dolci, nelle acque reflue, nelle acque di rubinetto ma anche negli oceani dove sono state rilevate concentrazioni di 1 mg/L (Paredes et al., 2014; Downs et al., 2015; Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2015). Altre evidenze sulla presenza dei filtri UV a livello globale sono state riportate da uno studio condotto sui campioni prelevati nell' Oceano Pacifico, Atlantico e Artico dove sono stati rilevati 4 differenti filtri UV organici: BP3, OCR, BMDBM e EHMC, con concentrazioni maggiori o uguali al 30% (Tsui et al., 2014).

## *1.2 Creme solari come inquinanti emergenti*

L'ampio utilizzo delle creme solari e la loro presenza nelle matrici ambientali ha reso necessario l'intervento di varie agenzie governative al fine di ridurre al minimo i loro effetti diretti e indiretti sugli ecosistemi acquatici. Il primo provvedimento è stato il disegno di legge varato nella legislatura statale hawaiana il 1° maggio 2018 (Camera dei Rappresentanti delle Hawaii Bill HB600 HD1 2017) che vieta la vendita e la distribuzione di creme solari contenenti oxybenzone e octinoxate (Barone et al., 2019). Il divieto è in vigore dal 1° gennaio 2021, ma si prevede che divieti simili si diffonderanno presto anche nelle altre aree del mondo in cui sono presenti barriere coralline (Raffa et al., 2019). In Europa, i rischi ecotossicologici per gli ambienti acquatici, dovuti all'uso di creme solari, dovrebbero essere valutati secondo delle condizioni standard di laboratorio imposte dalla Direttiva REACH (registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche) (Fastelli & Renzi, 2019). Da maggio 2018, REACH si applica a qualsiasi prodotto chimico fabbricato e commercializzato in Europa in quantità maggiori ad 1 tonnellata/anno, mentre al di sotto di questa quantità non è ancora stato regolamentato (Fastelli & Renzi, 2019). La direttiva impone a tutti i produttori di raccogliere informazioni sulle proprietà chimiche prima dell'immissione sul mercato, al fine di gestire i rischi riguardanti la salute umana e l'ambiente causati dalle sostanze industriali prodotte o importate nell'UE (Comunità Europea, 2006; Sobek et al., 2013). In questa procedura vengono principalmente valutati gli elementi attivi delle creme solari, ossia i filtri UV classificati in organici (chimici) e inorganici (fisici) (Bilal et al., 2020). I filtri UV organici includono un gruppo eterogeneo di molecole caratterizzate da anelli aromatici in grado di assorbire le radiazioni UV-A (320–400 nm) e UV-B (280-320 nm) (Fagervold et al., 2019). Nell'ultimo decennio, tipicamente, le creme solari sono state formulate sulla base di filtri UV inorganici tra cui gli ossidi di zinco (ZnO) (Turja et al., 2014) e di titanio (TiO<sub>2</sub>) (Bouillon, 2000; Sureda et al., 2018), comunemente utilizzati nelle forme di nanoparticelle (NP, con dimensioni  $\leq 100$  nm; Osterwalder et al., 2014; Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2015). L'utilizzo di filtri fisici è in costante crescita anche se i filtri chimici continuano a prevalere nei prodotti per la protezione solare attualmente presenti sul mercato (Ruszkiewicz et al., 2017). Tuttavia, i filtri inorganici una volta rilasciati in mare, possono produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Miller et al., 2021) e in particolare, le

NP di ZnO inducono il fenomeno dello sbiancamento dei coralli, provocando la morte delle zooxantelle simbiotiche e arricchimento microbico in mare (Corinaldesi et al., 2018). Inoltre, è stato dimostrato che ZnO e TiO<sub>2</sub> possono provocare effetti tossici a lunga durata su diversi organismi marini appartenenti a diversi livelli trofici (Zhang et al., 2012; Ma et al., 2011; Suman et al., 2015; Bilal et al., 2020; Sobek et al., 2013).

La concentrazione dei filtri UV nella preparazione della crema solare è un criterio fondamentale in quanto determina il potere protettivo del prodotto finale (Forestier, 2008). Un maggior livello di protezione può essere ottenuto aumentando la concentrazione del filtro e/o utilizzando una corretta combinazione di filtri (Forestier, 2008). La miscela finale non solo deve soddisfare le esigenze dei consumatori ma deve rispettare anche le leggi preposte dagli stati sulla loro formulazione (Casas-Beltrán et al., 2021). In particolare, i regolamenti impongono che ciascun ingrediente non debba superare più del 40% della composizione totale mentre altri, ritenuti potenzialmente dannosi per la salute umana e ambientale, debbano costituire meno del 10% della miscela totale (Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2015; Casas-Beltrán et al., 2021). Nell'Unione Europea (UE) i prodotti per la protezione solare sono definiti come prodotti cosmetici (Sobek et al., 2013) e si permette l'uso di 27 filtri UV, di cui solo due inorganici (TiO<sub>2</sub> e ZnO) (Cadena-Aizaga et al., 2020). Negli Stati Uniti, invece, sono classificati come prodotti da banco (OTC) e sono consentiti solo 16 filtri UV (US Congress, 2014; FDA, 2011, 2019; Miller et al., 2021). Sono utilizzati in entrambi i casi con restrizioni sulla percentuale massima del prodotto finale, come si può osservare in Tabella 1.1:

**Tab. 1.1:** Concentrazioni massime, espresse in percentuale, di filtri UV che possono essere utilizzate nell'Unione Europea e negli Stati Uniti per la formulazione delle creme solari (ove mancante il valore, il filtro non è consentito) (Ahmed, 2008; Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2015; CD, Allegato VII; Sobek et al., 2013; Huang et al., 2020; Cadena-Aizaga et al., 2020; Paredes et al., 2014).

<b>Nome INCI</b>	<b>Concentrazioni massime (%) UE</b>	<b>Concentrazioni massime (%) USA</b>
3-benzilidene canfora (3-BC)	2	-
4-metilbenzilidene canfora (4-MBC)	4	-
Benzofenone 3 (BP-3)	6	6
Benzofenone 4 (BP-4)	5	10
Etilsil Metossicinnamato (EHMC)	10	10
Bis-Etilsilossifenolo Metossifenil Triazina (BEMT)	10	-
Dietilammino Idrossi Benzoile Esil Benzoato (DHHB)	10	-
Dietilesil Butamido Triazone (DBT)	10	-
Etilsil Salicilato (ES)	5	5
Etilsil Triazone (ET)	5	-
Metilene Bis-Benzotriazolil Tetrametilbutilfenolo (MBBT)	10	-
Acido Fenil Benzimidazolo Solfonico (PBSA)	8 (se espresso come acido)	5

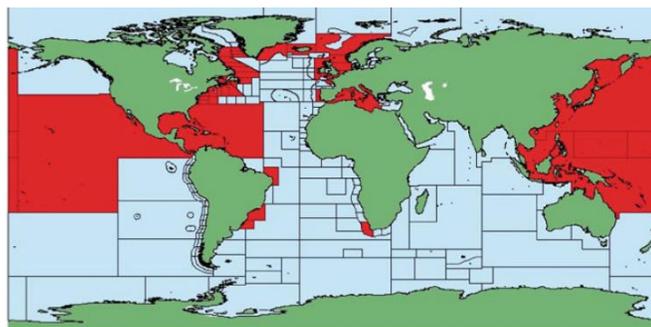
Nello studio condotto da Rodríguez et al., (2015), sono stati rilevati 8 filtri UV organici nella frazione disciolta delle acque costiere di sei differenti spiagge di Gran Canaria nel 2011, tra cui dietilammino idrossi benzoile esil benzoato (DHHB), filtro presente nelle creme solari oggetto di studio di questa tesi. Le più alte concentrazioni osservate appartenevano a OC, BMDBM e BP-3, a causa del loro ampio impiego nelle formulazioni di creme solari. DHHB presentava basse concentrazioni, in quanto risulta essere l'ultimo filtro UV organico ad essere stato approvato per l'uso nei cosmetici nella Direttiva Europea 2005/9/EC (European Commission, 2005; Rodríguez et al., 2015). Altri importanti filtri contenuti nelle creme solari considerate sono dietilesil butamido triazone (DBT), metilene bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenolo (MBBT) e bis-etilesilossifenolo metossifenil triazina (BEMT). Tuttavia, in un recente studio, anch'essi sono stati rilevati sia in acqua che nel sedimento di alcuni siti localizzati in Francia (Fagervold et al., 2019). Alcuni di questi filtri tra cui

octinoxate, benzofenone-2 e benzofenone-3, hanno dimostrato la capacità di agire come interferenti endocrini (Schlumpf et al., 2001; Holbech et al., 2002; Giokas et al., 2007; Bilal et al., 2020). Inoltre, sotto i raggi UV alcuni filtri organici, come l'acido fenilbenzimidazolo solfonico (PBSA), possono generare ROS sulla pelle e in soluzione acquosa ( $O_2^-$ , OH,  $H_2O_2$ , ecc.; Allen et al., 1996; Hanson et al., 2006; Inbaraj et al., 2002; Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2014; Serpone et al., 2002; Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2015; Westphal et al., 2020). Queste specie ossidanti possono danneggiare lipidi, proteine e DNA e generare alti livelli di stress nelle cellule degli organismi marini (Lesser, 2006; Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2015). Recenti studi hanno rivelato che alcuni filtri UV possono subire una degradazione, principalmente per fotolisi (Sakkas et al., 2003; Kockler et al., 2012) o per reazione con cloro nei mezzi clorurati (Sakkas et al., 2003; Kockler et al., 2012; Negreira et al., 2008; Nakajima et al., 2009; Duirk et al., 2013; Grbović et al., 2013). Di conseguenza, spesso non vengono rilevati perché sono degradati in prodotti di trasformazione (Díaz-Cruz et al., 2008; Li et al., 2017; Cadena-Aizaga et al., 2020) e sono solitamente segnalati come più tossici rispetto ai composti iniziali (Grbović et al., 2015). Gli effetti tossici di DHHB e dei suoi prodotti clorurati sono stati studiati sul batterio marino *Vibrio fischeri* e sul crostaceo di acqua dolce *Daphnia magna* da Grbović et al., (2015). In *Vibrio*, entrambe le molecole riducono del 20% la bioluminescenza dopo 30 minuti di esposizione, mentre in *Daphnia* vi è un maggior effetto dato dai prodotti clorurati (Grbović et al., 2015).

Thorel et al., (2020) ha valutato la tossicità di 10 comuni filtri UV: BP-3, BEMT, BM, DHHB, DBT, ethylhexyl salicylate (ES), ethylhexyl triazone (ET), HS, MBBT e OC su due organismi modello, *Tetraselmis* sp. e *Artemia salina*. Per quest'ultima specie, la sostanza più tossica in termini di mortalità è OC, seguita da BM e da HS. Dopo 7 giorni di esposizione, HS, BP-3 e ES hanno determinato una notevole riduzione della crescita algale, mentre non è stata alterata da BEMT, BM, DBT, DHHB, ET e da MBBT (Thorel et al., 2020). ES ed ET sono stati oggetto di poche indagini relative agli organismi marini principalmente focalizzate su specie di corallo tropicali (Danovaro et al., 2008; Fel et al., 2018), i cui risultati mostravano che queste sostanze non rappresentano un grave pericolo se considerate singolarmente (Tovar-Sánchez, Sánchez-Quiles & Blasco, 2020). Inoltre, ricerche recenti hanno dimostrato che alcuni filtri UV possono avere un impatto sulla salute dei coralli, provocando sbiancamento e aumento della mortalità (Corinaldesi et al., 2018; Danovaro et al., 2008;

Downs et al., 2014, 2016; Fel et al., 2019; He et al., 2019; McCoshum et al., 2016; Sharifan, 2020; Stien et al., 2019, 2020; Wijgerde et al., 2020; Miller et al., 2021), con notevole incremento della produzione virale in mare il quale induce il ciclo litico nei procarioti con l'equivalente infezione latente negli eucarioti ospiti (nota come infezione lisogenica nei procarioti) (Danovaro & Corinaldesi, 2003; Raffa et al., 2019).

I filtri UV organici sono caratterizzati da idrofobicità, rendendo probabile il loro accumulo nei sedimenti e nel biota (Tovar-Sánchez, Sánchez-Quiles & Blasco, 2020) in particolare nelle aree in cui l'uso delle creme solari è più elevato (Fig. 1.2). Infatti, è stato dimostrato che alcuni filtri UV organici (come 2-idrossi-4-metossibenzofenone, 4-metilbenzilidene canfora (4-MBC), BP-3, PBSA, isoamil 4-metossicinnamato o 2-etilesil salicilato tra gli altri) sono risultati bioaccumulabili in mitili (Castro et al., 2018; Vidal-Liñán et al., 2018), granchi, gamberi, calamari e pesci (Peng et al., 2017; Molins-Delgado et al., 2018; Grabicova et al., 2013; Westphal et al., 2020), nei ricci di mare (Rocha et al., 2018), nel fegato di delfini della costa del Brasile (Gago-Ferrero et al., 2013) e di cormorani della Svizzera (Fent et al., 2010), suggerendo anche la loro biomagnificazione (Molins-Delgado et al., 2017; Tovar-Sánchez & Sánchez-Quiles, 2019) e di conseguenza la possibilità di raggiungere gli esseri umani attraverso la catena alimentare (Ruszkiewicz et al., 2017).



**Fig. 1.2:** Aree di pesca della FAO dove è stato riportato il bioaccumulo di filtri UV. Le porzioni di colore rosso indicano le aree di pesca con il biota marino contenente filtri UV (Tovar-Sánchez, Sánchez-Quiles & Blasco, 2020).

Oltre ai filtri UV, le creme solari commerciali contengono una grande varietà di altri ingredienti chimici, come emollienti, emulsionanti, filmogeni, booster, stimolatori sensoriali (Osterwalder et al., 2014; He et al., 2018) e in alcuni casi antiossidanti (come vitamina C ed E per ridurre lo stress ossidativo generato dalle ROS formate tramite radiazioni UV; Sánchez-

Quiles & Tovar-Sánchez, 2015). È stato dimostrato che anche questi possono produrre notevoli impatti su ecosistemi ed organismi marini; ad esempio ascorbyl palmitate, usato come antiossidante, è stato testato su *Daphnia magna* ed è risultato tossico, così come già dimostrato per alcuni organismi tra cui i dafnidi e i pesci (Consortium 2002; Orvos et al., 2002; Ishibashi et al., 2004; Tatarazako et al., 2004; Chalew & Halden, 2009; Dhillon et al., 2015; Talapatra & Konar, 2016). Altri studi hanno concluso che il glicole propilenico puro, utilizzato come solvente, risulta essere tossico in alcune specie di alghe acquatiche (*Selenastrum capricornutum*, *Lemna minor*, *Skeletonema costatum* e *Scenedesmus quadricauda*; Pillard & Dufresne, 1999). Le creme contengono anche trietanolamina, appartenente alla famiglia delle etanolammine, utilizzata come emulsionante; anche se viene classificata come priva di tossicità acuta, potrebbe avere degli effetti a lungo termine a causa della sua bassa biodegradabilità (Libralato et al., 2010). Anche se gli ftalati non sono menzionati nella lista degli ingredienti del prodotto, potrebbero far parte della formulazione e sono noti come fragranze (Maipas et al., 2015). Le fragranze sono state associate a diversi problemi di salute, come irritazioni della pelle e reazioni allergiche, ma numerosi studi hanno evidenziato che potrebbero potenzialmente causare anche problemi ambientali in quanto hanno una bassa biodegradabilità (Bickers et al., 2003; Bridges, 2002; Sakamoto et al., 2017; Bom et al., 2019). Infine, le creme solari sono state identificate come una fonte significativa di nutrienti inorganici, principalmente  $PO_4^{3-}$  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 rischio come i metalli (Zmozinski et al., 2016) molti dei quali (cioè Al, Zn, Mg, Fe, Mn, Cu, Cr e Pb) sono stati rilevati e quantificati nelle creme solari (Zachariadis et al., 2009; Tovar-Sánchez et al., 2013; Rodríguez-Romero et al., 2019). I test per valutare l'impatto ecologico di questi prodotti vengono spesso eseguiti utilizzando organismi modello appartenenti a specie di acqua dolce mentre i test su specie marine chiave non sono attualmente regolamentati e quindi vengono eseguiti occasionalmente o utilizzando concentrazioni di componenti che non sono realmente quelle rilevate in natura (Fastelli & Renzi, 2019). Dovrebbero quindi essere condotte ulteriori ricerche sugli effetti ambientali e sulla tossicità dei filtri UV più comuni utilizzando organismi marini al fine di determinare, con maggiore precisione, il rischio complessivo associato ad essi (Rodriguez et al., 2015).

### *1.3 Paracentrotus lividus: importanza nell'ecosistema costiero e utilizzo come organismo modello negli studi ecotossicologici*

I ricci di mare sono considerati una specie chiave nella strutturazione degli ecosistemi marini poiché rappresentano organismi alla base della rete trofica e controllano gli equilibri della popolazione algale della quale si nutrono durante la loro attività di pascolo: una diminuzione della popolazione di questi echinodermi può portare ad una proliferazione di organismi autotrofi, così come una loro sovrappopolazione può portare a fondali privi di vegetazione con conseguente perdita di biodiversità (Bacetti et al., 1994; Mojetta et al., 2003; Bodini et al., 2007).

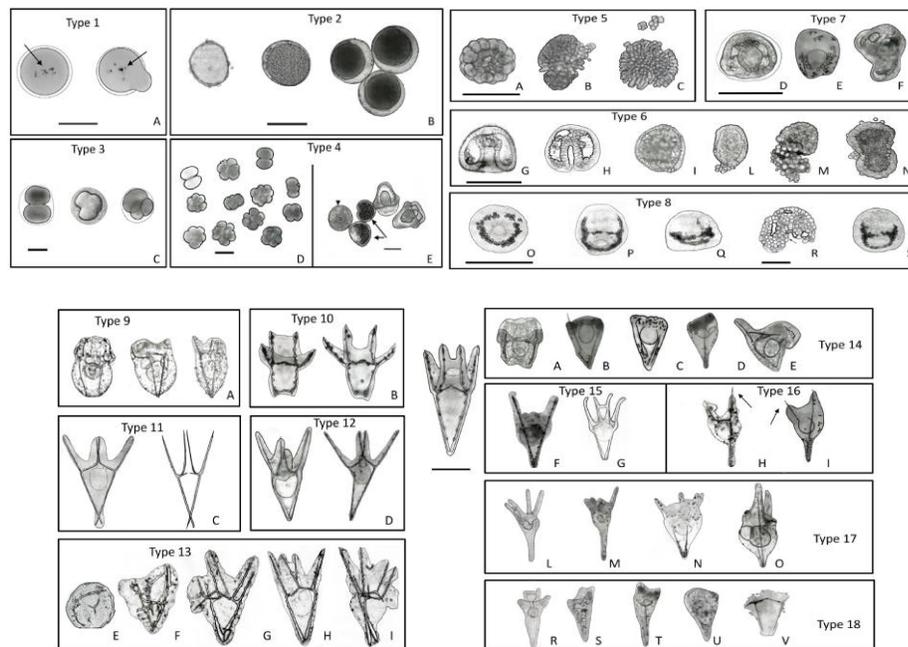
Tra questi, vi è *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816; phylum Echinodermata, classe Echinoidea), un riccio relativamente grande, con il diametro della teca (senza gli aculei) che può raggiungere i 7.5 cm (Bonnet, 1925; Boudouresque et al., 1989; Lozano et al., 1995; Sartori et al., 2017). La distribuzione geografica della specie comprende la costa atlantica che va dall'Irlanda al Marocco, incluse le isole Canarie e Azzorre e le coste di tutto il Mar Mediterraneo (Hayward and Ryland, 1990; San Martín, 1995). Qui, *P. lividus* è comune in habitat rocciosi subtidali poco profondi e in letti di *Posidonia oceanica* dove spesso dimora sui rizomi tra i germogli (Ceccherelli et al., 2009). Le popolazioni di *P. lividus* presenti nel Mediterraneo Nord-occidentale hanno un unico periodo di emissione dei gameti (Lozano et al., 1995; Fernandez, 1998; Sánchez-España et al., 2004; Ouréns et al., 2011), che tipicamente è compreso tra ottobre e giugno (Arizzi Novelli et al., 2002) con un massimo all'inizio della primavera quando le temperature sono comprese tra 13.5 e 18 °C (Byrne et al., 1990; Lozano et al., 1995; Sphigel et al., 2004). I maschi emettono per primi e le uova mature sono quindi rilasciate in una nuvola di spermatozoi che nuotano attivamente. La fecondazione è quindi esterna e lo sviluppo embrionale avviene nel plancton (Sartori et al., 2017). Nello specifico, dopo l'unione dei gameti, attraverso una serie di passaggi, vi è l'innalzamento della membrana di fecondazione, con conseguente blocco della polispermia e formazione dell'embrione. Da qui si verificano una serie di divisioni cellulari, sempre racchiuse nella membrana di fecondazione, che portano allo stadio di morula. Dopo sei ore, l'embrione entra nella fase di blastula precoce con una cavità centrale (blastocoele) e schiude dalla membrana di fecondazione. A questo punto i micromeri si differenziano nelle cellule

del mesenchima primario (PMC) originando lo stadio di blastula con mesenchima. Poco dopo si verifica la gastrulazione con la formazione dell'archenteron, il quale, estendendosi verso l'alto, forma da un'estremità la bocca e dall'altra l'ano (stadio di prisma). Dopo 48 ore dalla fecondazione, si differenzia la larva o pluteo in cui la regione circumorale dà origine a quattro braccia, sostenute da piccole scheletriche calcaree (Sartori et al., 2017).

Considerati i tempi rapidi di sviluppo, dagli inizi del secolo scorso, *P. lividus* è stato utilizzato come un valido strumento per gli studi di sviluppo embrionale ed ecotossicologici, in quanto, sia i gameti che gli embrioni permettono di valutare la tossicità di una vasta gamma di contaminanti, come ad esempio nanoparticelle (NP), prodotti farmaceutici e prodotti per la cura personale (PPCP) (Rosenfeld e Feng, 2011; Corinaldesi et al., 2017; Alijagic et al., 2020; Gambardella et al., 2021) che contribuiscono allo stress ambientale cui sono sottoposti gli organismi marini (Migliaccio et al., 2014; Matranga et al., 2012). In particolare, viene utilizzato lo sviluppo embrionale di *P. lividus* poiché le sue uova possono essere fecondate e sviluppate in modo sincrono in laboratorio consentendo un'immediata percezione visiva delle anomalie (Sartori et al., 2017), classificate come reversibili e irreversibili. Le prime includono anomalie dovute a cause naturali che possono essere recuperate una volta che le larve di riccio di mare sono riportate in condizioni ambientali ottimali. Le anomalie irreversibili, invece, sono considerate letali, poiché impediscono l'ulteriore sviluppo e compromettono il successo riproduttivo (Gambardella et al., 2021).

La Figura 1.3 rappresenta le principali anomalie di *P. lividus*, determinate dall'esposizione a diversi contaminanti, raggruppate per tempi di sviluppo. Durante lo stadio embrionale è possibile trovare: uova polispermiche causate dall'alterazione del blocco della polispermia con conseguente destabilizzazione della membrana di fecondazione (Tipo 1, A); comparsa di vescicole e di materiale denso nello spazio perivitellino (Tipo 2, B); divisione asimmetrica dei blastomeri (Tipo 3, C); ritardo nell'elevazione della membrana di fecondazione e conseguente asincronia negli eventi successivi (Tipo 4, D-E). Le anomalie durante lo stadio di morula e gastrula comprendono: disaggregazione embrionale dovuta alla perdita di adesione tra le cellule (Tipo 5, B-C); formazione di esogastrula a causa del collasso delle cellule endodermiche e/o ectodermiche (Tipo 6, I-N); arresto dello sviluppo allo stadio di gastrula (Tipo 7, E-F) e gastrule prive di celoma a causa di una migrazione anomala delle

cellule del mesenchima primario (PMC) (Tipo 8, Q-S). Nello stadio di larva, detta anche pluteo, invece è possibile trovare: piccole larve con aspetto rigonfio dall'apparato scheletrico ridotto (Tipo 9, A); plutei corti con apparato scheletrico non unificato apicalmente (Tipo 10, B); larve con apparato scheletrico delle braccia anteriori fuso o con apice incrociato (Tipo 11, C); corpo larvale asimmetrico o piegato (Tipo 12, C); larve con apparato scheletrico parzialmente o interamente raddoppiato (Tipo 13, E-I); grave regressione scheletrica di solito nelle braccia, o in entrambe le parti del corpo larvale (Tipo 14, A-E); lieve regressione scheletrica in cui le braccia sono flaccide (Tipo 15, F-G); regressione della parte molle (Tipo 16, H-I); larve con intestino e ano gonfi e dilatati (Tipo 17, L-O) e larve morte o con anomalie letali (Tipo 18 R-V).



**Fig.1.3:** Principali malformazioni di *P. lividus* durante lo stadio embrionale e larvale (Gambardella et al., 2021).

A seguito dell'esposizione a metalli pesanti, come cadmio, manganese, rame, piombo e cromo, si osservano anomalie delle uova fecondate e nelle prime fasi di sviluppo. Gli stadi precoci di diverse specie di ricci di mare possono essere sensibili ad inquinanti organici persistenti (POPs), come IPA (idrocarburi policiclici aromatici) (Bresch et al., 1972; Hose et al., 1983; Pillai et al., 2003; Suzuki et al., 2015) e PCB (composti policlorobifenili) (Adams, 1983; Pagano et al., 1985; Anselmo et al., 2011). Anche l'esposizione a distruttori endocrini ha provocato anomalie morfologiche in tutte le fasi di sviluppo investigate (a partire dalla

fecondazione fino a 96 ore post fecondazione) del *P. lividus*. È stato dimostrato che diversi surfattanti sono in grado di alterare la divisione e l'ulteriore sviluppo dei ricci di mare (Gambardella et al., 2021), tra questi, decil glucoside, sembra essere in grado di inibire la pompa H<sup>+</sup>/ATPasi dal momento che determina una maggiore acidificazione delle uova fecondate per via dell'accumulo di protoni nel citoplasma (Amouroux et al., 1999).

L'esposizione di *P. lividus* alle NP di ZnO causa la diminuzione dell'attività mitotica, che potrebbe indicare un effetto di disturbo del normale ciclo cellulare, bloccando la mitosi durante l'interfase (Elghamery et al., 2000). Come conseguenza, si registra un aumento delle aberrazioni cromosomiali negli embrioni. Le alterazioni morfologiche, osservate durante lo sviluppo di *P. lividus*, che presentano un effetto dose dipendente (Prato et al., 2021), potrebbero quindi essere collegate alle aberrazioni osservate nella fase di blastula. Questi eventi non dipendono unicamente dal rilascio di ioni zinco; i possibili meccanismi di tossicità includono la formazione di ROS e l'uptake nucleare diretto durante la divisione mitotica (Sharma et al., 2009; Oliviero et al., 2017). In ogni caso, gli ioni zinco possono anche avere un importante ruolo nella genotossicità. Se presenti in alte concentrazioni, inducono la distruzione delle funzioni mitocondriali (Wiseman et al. 2007), aumentando la produzione di ROS (Xia et al., 2008; Oliviero et al., 2019). Inoltre, è possibile che gli ioni zinco riducano la calcificazione dello scheletro, sostituendo gli ioni calcio negli embrioni (Cunningham et al., 2020).

Uno studio relativo all'esposizione alle NP di TiO<sub>2</sub>, indica che queste ultime non mostrano impatti dannosi verso lo sviluppo o l'immunità del riccio se vengono considerate le concentrazioni presenti in prossimità delle coste durante le attività ricreative estive (Catalano et al., 2020). È stato inoltre svolto uno studio per comprendere l'interazione che si verifica tra le NP di TiO<sub>2</sub> con le cellule immunitarie di riccio. Si è visto che avviene la soppressione dell'espressione di geni che codificano per proteine coinvolte nella risposta immunitaria e nella regolazione di recettori cellulari di superficie (Alijagic et al., 2020).

In merito ai filtri UV organici, Paredes et al., (2014) ha effettuato uno studio comparativo sugli effetti di 4 filtri UV (4-MBC, BP-3, BP-4 e EHMC) su diversi organismi marini, tra cui *P. lividus*. I risultati hanno mostrato che le larve di *P. lividus* sono più colpite dall'esposizione a EHMC e 4-MBC rispetto a BP-3 determinando malformazioni simili a quelle riscontrate

dalle larve esposte a metalli in tracce come rame, mercurio, cadmio, piombo o zinco (Fernández & Beiras, 2001; Beiras & Albentosa, 2004; Perez & Beiras, 2010; Paredes et al., 2014).

Successivamente, Corinaldesi et al., (2017) ha studiato gli effetti di 3 diverse creme solari commercializzate in Europa e negli USA, al fine di valutare gli impatti sullo sviluppo embrionale e larvale di *P. lividus*. La percentuale di embrioni anomali aumenta nel tempo dopo l'aggiunta di crema A a base di TiO<sub>2</sub> in tutte le concentrazioni utilizzate (10, 20, 50 µL/L); la percentuale aumenta anche dopo l'aggiunta di crema B contenente alcuni ingredienti come il benzofenone e omosalato o conservanti, raggiungendo il 100% se trattati con la concentrazione più elevata. Nessuna differenza nella percentuale di embrioni di *P. lividus* è stata osservata tra le varie concentrazioni di crema C (con DHHB, MBBT e ET come filtri UV organici e acido sorbico come conservante) e il controllo.

L'interesse della comunità scientifica è stato principalmente focalizzato sull' utilizzo dei filtri UV inorganici perché erano considerati “reef friendly” ed ecocompatibili utilizzando il riccio di mare come organismo modello (Bom et al, 2019; Miller et al., 2021; Catalano et al., 2020). Di conseguenza, i filtri UV organici, recentemente usati nelle creme solari, sono relativamente poco studiati e gli effetti che possono provocare sul biota marino non sono chiari, aprendo le porte alla necessità di approfondire gli studi utilizzando un maggior numero di organismi modello appartenenti a diversi livelli trofici con differenti metodologie (Carvalhais et al., 2021).

## 2. Obiettivi

L'obiettivo della seguente tesi mira a valutare i potenziali effetti di prodotti solari contenenti filtri UV organici sul riccio di mare *Paracentrotus lividus* che rappresenta una specie chiave degli ecosistemi costieri del Mar Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico orientale ed è uno degli organismi modello più comuni per gli studi ecotossicologici. Per fare ciò, sono stati valutati gli effetti delle creme solari sullo sviluppo embrionale e larvale e analizzati 15 geni coinvolti nella risposta allo stress nelle larve di *P. lividus*. Sono state utilizzate 14 creme solari, di cui 13 in crema ed una stick, caratterizzate da diversa composizione in termine di filtri UV organici, emollienti, emulsionanti, fragranze ecc., al fine di identificare i potenziali responsabili degli impatti indotti.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1 *Creme solari considerate*

Nella seguente tesi sono state utilizzate 14 creme solari (13 in crema ed una in stick), caratterizzate da composizioni differenti in termini di filtri UV, conservanti, emulsionanti, idratanti e altri ingredienti. I diversi componenti, di seguito riportati, sono indicati secondo il loro nome INCI (Nomenclatura Internazionale degli Ingredienti Cosmetici).

**Spray SPF-50+ formula n. 11137 (S1):** contenente diversi filtri UV (diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, ethylhexyl salicylate, ethylhexyl triazone, diethylhexyl butamido triazone), emollienti (dicaprylyl carbonate, propylene glycol dicaprylate/dicaprate, dibutyl adipate, sucrose polystearate, hydrogenated polyisobutene), agenti di controllo della viscosità (acrylates/c12-22 alkyl methacrylate copolymer, microcrystalline cellulose, vp/hexadecene copolymer), emulsionanti (disodium cetearyl sulfosuccinate, xanthan gum), umettanti (glycerin), tensioattivi (coco-glucoside), conservanti (phenoxyethanol), antiossidanti (hydroxyacetophenone), agenti filmogeni (cellulose gum), regolatori di pH (citric acid) e altri (parfum, sodium gluconate, L-Arginin).

**Spray SPF-30 formula n. 11299 (S2):** contenente diversi filtri UV (diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, ethylhexyl salicylate, ethylhexyl triazone), emollienti (dicaprylyl carbonate, propylene glycol dicaprylate/dicaprate, dibutyl adipate, sucrose polystearate, hydrogenated polyisobutene), agenti di controllo della viscosità (acrylates/c12-22 alkyl methacrylate copolymer, microcrystalline cellulose, vp/hexadecene copolymer), emulsionanti (disodium cetearyl sulfosuccinate, xanthan gum), umettanti (glycerin), tensioattivi (coco-glucoside), conservanti (phenoxyethanol), antiossidanti (hydroxyacetophenone), agenti filmogeni (cellulose gum), regolatori di pH (citric acid) e altri (parfum, sodium gluconate, L-Arginin).

**Crema SPF-30 formula n.11300 (S3):** contenente diversi filtri UV (methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (nano), diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, ethylhexyl triazone, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine), emollienti (dicaprylyl carbonate, sucrose polystearate, hydrogenated polyisobutene, glyceryl stearate, cetearyl alcohol), regolatori di pH (citric acid), umettanti (propylene glycol, glycerin), emulsionanti (xanthan gum), conservanti (phenoxyethanol), antiossidanti (hydroxyacetophenone), tensioattivi (decyl glucoside) ed altri (caprylic/capric triglyceride, sodium gluconate, parfum).

**Crema SPF-30 formula n. 11301 (S4):** contenente diversi filtri UV(methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (nano), diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, ethylhexyl triazone, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine), emollienti (dicaprylyl carbonate, hydrogenated polyisobutene, glyceryl stearate, cetearyl alcohol, sucrose polystearate), umettanti (propylene glycol, glycerin), emulsionanti (xanthan gum), conservanti (phenoxyethanol), regolatori di pH (citric acid), antiossidanti (hydroxyacetophenone), tensioattivi (decyl glucoside, disodium cetearyl sulfosuccinate), agenti di controllo della viscosità (hydroxyethylcellulose) ed altri (caprylic/capric triglyceride, parfum, sodium gluconate).

**Crema SPF-50 formula n. 11302 (S5):** contenente diversi filtri UV (diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (nano), bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, ethylhexyl triazone), emollienti (dicaprylyl carbonate, hydrogenated polyisobutene, glyceryl stearate, cetearyl alcohol, sucrose polystearate), umettanti (propylene glycol, glycerin), emulsionanti (xanthan gum), conservanti (phenoxyethanol), regolatori di pH (citric acid), antiossidanti (hydroxyacetophenone), tensioattivi (decyl glucoside) ed altri (caprylic/capric triglyceride, parfum, sodium gluconate).

**Crema SPF-50 formula n. 11303 (S6):** contenente diversi filtri UV (diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (nano), bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, ethylhexyl triazone), emollienti (dicaprylyl carbonate, hydrogenated polyisobutene, glyceryl stearate, cetearyl alcohol, sucrose polystearate), umettanti (propylene glycol, glycerin), emulsionanti (xanthan gum), conservanti (phenoxyethanol), regolatori di pH (citric acid), antiossidanti (hydroxyacetophenone), tensioattivi (decyl glucoside) ed altri (caprylic/capric triglyceride, sodium gluconate).

**Crema SPF-50 formula n. 11304 (S7):** contenente diversi filtri UV (diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (nano), ethylhexyl triazone, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine), emollienti (dicaprylyl carbonate, hydrogenated polyisobutene, glyceryl stearate, cetearyl alcohol, sucrose polystearate), umettanti (propylene glycol, glycerin), emulsionanti (xanthan gum), conservanti (phenoxyethanol), regolatori di pH (citric acid), antiossidanti (hydroxyacetophenone), tensioattivi (decyl glucoside, disodium cetearyl sulfosuccinate), agenti di controllo della viscosità (hydroxyethylcellulose) ed altri (caprylic/capric triglyceride, sodium gluconate).

**Crema SPF-50 formula n. 11305 (S8):** contenente diversi filtri UV (diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (nano), ethylhexyl triazone, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine), emollienti (dicaprylyl carbonate, hydrogenated polyisobutene, glyceryl stearate, cetearyl alcohol, sucrose polystearate), umettanti (propylene glycol, glycerin), emulsionanti (xanthan gum), conservanti (phenoxyethanol), regolatori di pH (citric acid), antiossidanti (hydroxyacetophenone), tensioattivi (decyl glucoside, disodium cetearyl sulfosuccinate), agenti di controllo della viscosità (hydroxyethylcellulose) ed altri (caprylic/capric triglyceride, parfum, sodium gluconate).

**Crema SPF-30 formula n. 11306 (S9):** contenente diversi filtri UV (ethylhexyl salicylate, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (nano), diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, ethylhexyl triazone, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine), emollienti (dicaprylyl carbonate, glyceryl stearate, cetearyl alcohol, propylene glycol dicaprylate/dicaprate, dibutyl adipate), umettanti (propylene glycol, glycerin), emulsionanti (xanthan gum), conservanti (phenoxyethanol), tensioattivi (decyl glucoside, disodium cetearyl sulfosuccinate, cetearyl glucoside), antiossidanti (hydroxyacetophenone), agenti di controllo della viscosità (sodium polyacrylate, acrylates/palmeth-25 acrylate copolymer), regolatori di pH (sodium hydroxide) ed altri (parfum, sodium gluconate).

**Crema SPF-50+ formula n. 11307 (S10):** contenente diversi filtri UV (ethylhexyl salicylate, ethylhexyl triazone, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (nano), diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine), emollienti (dicaprylyl carbonate, glyceryl stearate, cetearyl alcohol, dibutyl adipate, propylene glycol dicaprylate/dicaprate), umettanti (propylene glycol, glycerin), emulsionanti (xanthan gum), conservanti (phenoxyethanol), tensioattivi (decyl glucoside, disodium cetearyl sulfosuccinate, cetearyl glucoside), antiossidanti (hydroxyacetophenone), agenti di controllo della viscosità (sodium polyacrylate, Acrylates/palmeth-25 acrylate copolymer), regolatori di pH (sodium hydroxide) ed altri (parfum, sodium gluconate).

**Crema SPF-50+ formula n. 11308 (S11):** contenente diversi filtri UV (ethylhexyl salicylate, ethylhexyl triazone, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (nano), diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine), emollienti (dicaprylyl carbonate, glyceryl stearate, cetearyl alcohol, dibutyl adipate, propylene glycol dicaprylate/dicaprate), umettanti (propylene glycol, glycerin), emulsionanti (xanthan gum), conservanti (phenoxyethanol), tensioattivi (decyl glucoside, disodium cetearyl sulfosuccinate, cetearyl glucoside), antiossidanti (hydroxyacetophenone), agenti di controllo della viscosità (sodium polyacrylate, acrylates/palmeth-25 acrylate copolymer), regolatori di pH (sodium hydroxide) ed altri (sodium gluconate).

**Collistar crema SPF-30 formula n.11328 (S12):** contenente diversi filtri UV (ethylhexyl salicylate, diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, phenylbenzimidazole sulfonic acid, ethylhexyl triazone, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, diethylhexyl butamido triazone), emollienti (coco-caprylate, caprylyl glycol, c12-15 alkyl benzoate, dibutyl adipate, lecithin), regolatori di pH (triethanolamine, citric acid, conservanti (phenoxyethanol), tensioattivi (potassium cetyl phosphate), agenti di controllo della viscosità (acrylates/palmeth-25 acrylate copolymer), antiossidanti (tocopheryl acetate, hydroxyacetophenone, tocopherol, ascorbyl palmitate), emulsionanti (zea mays oil, polyacrylate crosspolymer-6, polyglyceryl-3 cocoate, xanthan gum), umettanti (mannitol, glycerin) ed altri (xanthophyll, biosaccharide gum-2, diatomaceous earth, lithothamnium calcareum powder , carthamus tinctorius seed oil, calendula officinalis flower extract, tetrasodium glutamate diacetate, opuntia ficus-indica stem extract , ethylhexylglycerin, zinc sulfate).

**Collistar crema SPF-50+ formula n.11327 (S13):** contenente diversi filtri UV (ethylhexyl salicylate, diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, phenylbenzimidazole sulfonic acid, ethylhexyl triazone, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, diethylhexyl butamido triazone), emollienti (coco-caprylate, caprylyl glycol, c12-15 alkyl benzoate, dibutyl adipate, lecithin), regolatori di pH (triethanolamine, citric acid, conservanti (phenoxyethanol), tensioattivi (potassium cetyl phosphate), agenti di controllo della viscosità (acrylates/palmeth-25 acrylate copolymer), antiossidanti (tocopheryl acetate, hydroxyacetophenone, tocopherol, ascorbyl palmitate), emulsionanti (zea mays oil, polyacrylate crosspolymer-6, polyglyceryl-3 cocoate, xanthan gum), umettanti (mannitol, glycerin) ed altri (xanthophyll, biosaccharide gum-2, diatomaceous earth, lithothamnium calcareum powder , carthamus tinctorius seed oil, calendula officinalis flower extract, tetrasodium glutamate diacetate, opuntia ficus-indica stem extract , ethylhexylglycerin, zinc sulfate).

**Collistar stick SPF-50+ formula n.11329 (Stick):** contenente diversi filtri UV

(diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, diethylhexyl butamido triazone, ethylhexyl triazone), emollienti (coco-caprylate/caprate, oleic acid, dicaprylyl carbonate), antiossidanti (tocopherol), umettanti (butylene glycol) ed altri (oleoyl tyrosine, dibutyl ethylhexanoyl glutamide , schizandra chinensis fruit extract, diethylhexyl syringylidenemalonate, dibutyl lauroyl glutamide, caprylic/capric triglyceride).

### 3.2 *Raccolta dei gameti, coltura degli embrioni, incubazioni con le creme solari*

Gli individui di *Paracentrotus lividus* sono stati raccolti durante la stagione riproduttiva in un'area costiera del Mar Adriatico Centrale (43°37'11.29"N 13°31'52.9"E) e trasportati in laboratorio all'interno di un frigorifero portatile avvolti in panni bagnati con acqua di mare, al fine di evitare un aumento di temperatura che potrebbe determinare l'emissione dei gameti (Sartori et al., 2017). È stato raccolto un numero di esemplari tale da poter garantire la presenza di più individui di ciascun sesso. Sono stati poi posti in vasca con acqua di mare circolante fino al loro utilizzo per gli esperimenti.



**Fig. 3.1:** Vasca per la conservazione degli individui di *P. lividus*.

In laboratorio, per stimolare il rilascio dei gameti dalla cavità anale, viene iniettato 1 mL di una soluzione 0,5 M di acetilcolina cloruro (Amemiya,1996) introdotta con una siringa a livello della membrana periboccale. In seguito, gli individui vengono leggermente agitati e posti in alcuni becker contenenti acqua di mare filtrata (FSW, con l'ausilio di filtri Advantec™ con porosità di 0.2  $\mu$ m) tenuta a 4°C prima del suo utilizzo. Se i gameti ottenuti sono di colore rosa-arancio si tratta di uova e pertanto si mantengono gli esemplari all'interno dei becker; se sono di colore bianco si tratta di spermatozoi e di conseguenza, gli individui vengono rimossi quanto prima poiché l'acqua di mare determina l'attivazione dei gameti i quali vengono raccolti tramite una pipetta, posti in una eppendorf e conservati a 4°C.



**Fig. 3.2:** Rilascio di uova (a sinistra) e di spermatozoi (a destra).

Al termine dell'emissione da parte delle femmine, le uova sono poste all'interno di becker per effettuare dei lavaggi. Dopo qualche minuto, si rimuove l'acqua in eccesso con una pipetta in plastica eliminando anche uova danneggiate (che, contrariamente a quelle sane, si trovano in sospensione) e si aggiunge ulteriore acqua. Questa procedura viene ripetuta per 3 volte. Il terzo lavaggio determina la concentrazione di uova presenti per mL. La quantità di uova da inserire per ciascun campione dovrebbe essere pari a 700 unità; pertanto, per effettuare una stima precisa, si prelevano 10  $\mu$ L di uova e vengono posti in una piastra contenente 1 mL di acqua, effettuando 3 repliche. Si osserva una quantità di 70 uova nei 10  $\mu$ L considerati, quindi, tramite una proporzione si comprende il volume da utilizzare, pari a

100  $\mu\text{L}$ , arrotondati a 120  $\mu\text{L}$ , per evitare una quantità di uova inferiore a quella necessaria. In seguito, vengono anche effettuate delle prove di fecondazione per testare la bontà delle uova e l'efficienza dello sperma; per fare ciò si pone su di una piastra una certa quantità della sospensione di uova a cui si aggiunge un'aliquota di sperma precedentemente diluito. Si osserva al microscopio l'avvenuta fecondazione. Gli embrioni così ottenuti vengono conservati a 18°C fino al raggiungimento della fase larvale. Una volta effettuati i controlli, si procede all'allestimento degli esperimenti.

### 3.3 *Set-Up Sperimentale*

In questa ricerca sono state utilizzate 14 creme solari, di cui uno stick. Quest'ultimo, non essendo solubile in acqua di mare né in solventi adeguati per l'esperimento, è stato testato distribuendo una quantità nota (2 mg/cm<sup>2</sup> di prodotto, dose raccomandata dalla FDA, Poiger et al., 2004) su una parte del corpo di un operatore (mano) che è stata immersa per 20 minuti (tempo medio di un bagno in mare; Danovaro et al., 2008) in acqua di mare pre-filtrata ed autoclavata. L'acqua di mare contenente il prodotto è stata così utilizzata per valutare gli effetti del rilascio diretto sugli organismi oggetto di analisi.

Le analisi sono state condotte in tre repliche per ciascun trattamento utilizzando come riferimenti sia un controllo sia un controllo mano (ponendo una mano priva di crema solare in stick all'interno di 1 L di acqua di mare filtrata per 20 minuti). I sistemi sperimentali sono stati preparati in barattoli da 120 mL, in cui sono stati aggiunti, nel seguente ordine, 49.22 mL di acqua di mare filtrata (FSW) a 0.2  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{L}$  di uova, 100  $\mu\text{L}$  di spermatozoi diluiti (1:1000) e 500  $\mu\text{L}$  delle diverse creme solari con una concentrazione di 50  $\mu\text{L}/\text{L}$  (non inserite nei controlli). Sono stati considerati diversi tempi di sviluppo, tra cui T<sub>0</sub> (che corrisponde a 20 minuti dalla fecondazione), T<sub>3</sub> (dopo 3 ore che corrisponde allo stadio di morula), T<sub>24</sub> (dopo 24 ore che corrisponde allo stadio di gastrula/prisma). Dopo 48 ore dalla fecondazione, si raggiunge la fase larvale, in cui le larve sono definite plutei. Si procede quindi ad allestire ulteriori barattoli in cui vengono inserite le medesime quantità precedentemente citate per i tempi T<sub>48</sub> (48 ore dopo la fecondazione) e T<sub>72</sub> (72 ore dopo la fecondazione). I campioni,

sono stati tenuti in una camera termostata a una temperatura di 18°C e, successivamente sono stati fissati con l'aggiunta di 2 mL di formalina pura e di 2 mL di etanolo al 70 %, sono conservati a 4°C.



**Fig. 3.3:** Conservazione dei diversi trattamenti a 18°C.

### *3.4 Analisi morfologica di uova e larve*

Lo stato di salute di embrioni e larve incubati con i differenti prodotti solari è stato valutato attraverso osservazioni al microscopio (Zeiss Axioskop-2 Mot con ingrandimento 10x) e classificati in base alla morfologia e sincronità dello sviluppo embrionale e larvale rispetto ai controlli. Considerando un totale di 300 embrioni e larve per ciascun barattolo (3 sub-repliche di circa 100 embrioni/larve ciascuno).

Si è proceduto alla loro classificazione sulla base della morfologia e del grado di sviluppo

embrionale e larvale rispetto ai controlli. Questa classificazione si basa sulle anomalie specifiche identificate e registrate da Carballeira et al. (2012), Gambardella et al. (2013, 2021) e Corinaldesi et al. (2017). In dettaglio, gli embrioni e le larve sono stati separati in normali e anomali, identificando, rispettivamente, 11 e 10 categorie di anomalie.

Le foto sono state scattate utilizzando il microscopio ottico Leica ICC50 W (Leica Microsystems) collegato ad una fotocamera digitale tramite l'applicazione AirLab v2.0 (Leica Microsystems) con un ingrandimento a 40x per gli embrioni fino a 24 ore di sviluppo e 10x per le larve.

### 3.5 *Indice di impatto delle creme solari (ISI)*

Le malformazioni osservate nei diversi tempi di sviluppo sono state classificate sulla base del grado di alterazione embrionale e larvale per stabilire la severità dell'impatto provocato dalle creme solari. Pertanto, al termine dell'esperimento è stata determinata la frequenza di anomalie per ciascun grado di alterazione embrionale e larvale, calcolando l'indice di impatto delle creme solari (ISI), come stabilito da Corinaldesi et al., (2017), ovvero:

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

Questo indice comprende 4 gradi di impatto (Tab. 3.1), da 0 (in cui sono compresi embrioni e larve normali) a 3 (che rappresenta il danno più severo).

**Tab. 3.1:** Indice di impatto delle creme solari (ISI) e gradi di impatto ambientale.

<b>ISI</b>	<b>Impatto Ambientale</b>
0	Nessuno
$0 < X < 1$	Lieve
$1 \leq X < 2$	Moderato
$2 \leq X \leq 3$	Elevato

### *3.6 Estrazione di RNA e sintesi di cDNA*

Circa 3000 uova fecondate sono state trattate in 50 ml di acqua di mare filtrata con i composti S4, S5, S6, S8, S9 ed S11 alla concentrazione finale di 50  $\mu\text{L/L}$ . I campioni sono stati raccolti dopo 48 ore quando gli embrioni avevano raggiunto lo stadio di pluteo. In seguito tali campioni sono stati centrifugati a 1800 rcf per 10 minuti in una centrifuga a 4° C (modello 5804/ 5804 R, Eppendorf). Viene rimosso il surnatante e il pellet è trasferito in eppendorf di 2 mL; vengono centrifugati a 4 °C per 5 minuti alla medesima velocità. Poi viene rimossa l'acqua con una pipetta Pasteur di vetro e vengono aggiunti 500  $\mu\text{L}$  di una soluzione di PBS 1x (tampone fosfato salino) allo scopo di stabilizzare gli acidi nucleici e viene effettuata una ulteriore centrifugazione. Infine la precedente soluzione è rimossa ed avviene l'aggiunta di 700  $\mu\text{L}$  della soluzione di RNAlater™ per stabilizzare e proteggere l'RNA cellulare e i campioni si conservano a -80 ° C fino al loro utilizzo.

L'estrazione di RNA è stata effettuata con l'ausilio di Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad Laboratories, California, USA). La scelta di questo kit è stata effettuata sulla base di Ruocco et al., (2017), secondo cui le maggiori quantità di RNA (tra 10 e 20  $\mu\text{g}$ ), con un numero di embrioni compreso tra 2500 e 5000, è ottenuto tramite il metodo Aurum che permette inoltre di avere un RNA con maggiore integrità. Questa procedura viene effettuata in diversi passaggi. Inizialmente si rimuove l'RNAlater™ dai campioni precedentemente conservati a -80 °C con l'aggiunta poi di PBS, seguita da una centrifugazione a 10.000xg (velocità utilizzata in tutti i passaggi) per rimuovere il surnatante. A seguito dell'aggiunta di soluzione di lisi e di etanolo al 70%, i campioni vengono nuovamente centrifugati rimuovendo l'eccesso ed inserendo la soluzione di lavaggio a bassa stringenza che viene rimossa dopo un passaggio in centrifuga. Per rimuovere il DNA residuo i campioni sono incubati con 80  $\mu\text{L}$  di DNase I per 20 minuti e successivamente sono stati effettuati dei lavaggi per aumentare la purezza dell'RNA estratto. Infine, L'RNA viene eluito con 50  $\mu\text{L}$  di buffer fornito dal kit. La qualità dell'RNA estratto è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0.8 % in tampone TAE 1x DEPC pH 8. Il tampone TAE

1x è stato preparato diluendo la soluzione madre TAE 50x costituita da 242 g di Tris base, 51 ml di acido acetico glaciale, 100 ml di EDTA-Na 0.5M per un volume finale di un litro. Tutti gli RNA sono risultati integri poichè erano ben visibili le bande degli RNA ribosomiali 28S e 18S. Per l'analisi quantitativa la concentrazione degli RNA estratti è stata determinata misurando l'assorbanza a 260 nm, mediante l'utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). La purezza dei campioni è stata determinata dall'analisi dei rapporti di assorbanza A260/A280 (per contaminazione da proteine) e A260/A230 (per contaminazione da alcoli). I rapporti calcolati per tutti i campioni sono risultati ottimali e compresi nell'intervallo  $1.8 < A260/A280 < 2$  e  $2 < A260/230 < 2.2$ , indicativi dell'assenza di alcoli e di proteine, che potrebbero compromettere le successive fasi di manipolazione.

Per ogni campione una quantità di 350 ng di RNA totale estratto è stata retrotrascritta con iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) che prevede l'aggiunta di 4 µL di 5x iScript Reaction Mix e 1 µL di iScript Reverse Transcriptase in un volume finale di 20 µL. La reazione è stata svolta nel termociclatore C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad), utilizzando il seguente protocollo termico: fase di innesco a 25 °C per 5 minuti, fase di retrotrascrizione a 46° C per 20 minuti, fase di inattivazione della trascrittasi inversa a 95 °C per 1 minuto e una fase finale a 4°C per un'ora. In seguito, è avvenuta l'aggiunta di 30 µL di Nuclease-free water in ciascuna minieppendorf e la conservazione a -20 °C fino al loro successivo utilizzo.

### *3.7 Identificazione dei geni e ottimizzazione della PCR per analisi di espressione genica*

Prima di procedere con l'esperimento è stato necessario svolgere un lavoro preliminare di bioinformatica per poter identificare i geni di stress da analizzare (Tab. 3.2). Per ciascun gene sono state considerate le coppie di primer specifiche precedentemente riportate in altri studi (per maggiori dettagli vedi Tab 3.3) verificando la loro specificità utilizzando la banca dati di NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati e purificati dalla ditta Sigma-Aldrich (Germania).

È stata effettuata inoltre una reazione preliminare di PCR per valutare l'efficienza dei primers

e per definire le condizioni ottimali da utilizzare nelle fasi successive. La reazione è stata effettuata nel termociclatore C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) in un volume finale di 25  $\mu$ L con 5  $\mu$ L di 5x MyTaq Reaction Buffer, 1.5  $\mu$ L di primer (Forward e Reverse) con concentrazione di 0.3  $\mu$ M a partire da una concentrazione iniziale di 100  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ L di MyTaq HS DNA Polymerase (Meridian Bioscience), 1  $\mu$ L di cDNA ed una certa quantità di acqua data dalla differenza con il volume finale, ovvero 15.5  $\mu$ L. È stato utilizzato il seguente protocollo termico: fase iniziale di denaturazione a 95° C per 1 min, 39 cicli con fase di denaturazione a 95 °C per 15 secondi, fase di annealing a 58 °C per 30 secondi, fase di allungamento a 72 °C per 30 secondi e fase di allungamento finale a 72° C per 10 minuti.

**Tab. 3.2:** Geni di *Paracentrotus lividus* analizzati e relative funzioni.

<b>Gene</b>	<b>Funzione</b>
<i>CAT</i>	proteina coinvolta nella difesa antiossidante
<i>MDR1</i>	trasportatori ABC (ATP-binding cassette)
<i>MnSOD</i>	enzimi che catalizzano la dismutazione dei radicali superossido ( $O_2^-$ ) in ossigeno molecolare ( $O_2$ ) e in perossido di idrogeno, determinando la difesa della cellulare dalle specie reattive dell'ossigeno
<i>gpx</i>	enzimi selenio-dipendenti che riducono $H_2O_2$ e acidi grassi idroperossidi
<i>tlr4</i>	proteine che mediano l'uptake cellulare e i processi infiammatori
<i>NF-kB</i>	complesso proteico che controlla la trascrizione del DNA e regola le attività di molti pathway intracellulari, svolgendo un ruolo importante nella risposta immunitaria, oncogenesi e apoptosi e nel determinare le risposte cellulari a stimoli extracellulari
<i>hsp70,hsp60,hsp 56</i>	proteine coinvolte nel ripiegamento e nello svolgimento di altre proteine, proteggendo la cellula dallo stress
<i>p38 MAPK</i>	proteina coinvolta nella produzione di citochinine, risposte infiammatorie e nel controllo della proliferazione cellulare
<i>pi3k</i>	famiglia di proteine eterodimeriche, costituite da una subunità catalitica e una regolatoria, coinvolte in numerose funzioni cellulari come: proliferazione, crescita, sopravvivenza, metabolismo e differenziamento

<i>14-3-3 ε</i>	proteina dello stress, coinvolta nella regolazione della trasduzione del segnale, nel controllo del ciclo cellulare, apoptosi e omeostasi cellulare
<i>jun</i>	fattore di trascrizione incluso nei network di regolazione genica che controllano la scheletogenesi
<i>jnk</i>	appartiene ad una famiglia di proteine chinasi, che svolgono un importante ruolo anche nel differenziamento delle cellule T e nel pathway dell'apoptosi cellulare. È responsivo a diversi fattori di stress, come alla radiazione ultravioletta, allo shock termico e osmotico. Nel riccio di mare la sua attività è richiesta per l'invaginazione dell'archenteron ma non del suo differenziamento
<i>tbk1</i>	proteina con un ruolo chiave nella risposta infiammatoria, principalmente relativa alle infezioni virali

**Tab. 3.3:** Numero di accesso in banca dati dei geni di *P. lividus*; nome dei primer, sequenza in direzione (5' → 3'), temperatura di annealing e lunghezza del prodotto di PCR amplificato in paia di basi (bp). N.B: I primer che presentano gli asterischi (\*) presentano numeri di accesso di *Strongylocentrotus purpuratus*.

Gene	N. Accesso	Primer	Sequenza (5'→3')	Dimensione amplicone (bp)
Catalasi ( <i>CAT</i> )* (Varrella et al., 2014)	SPU_000281.1	PI-CAT_For PI-CAT_Rev	GACTTCGCTTCACCGACGAG GACTCAAAGGGTGCAGCCTTG	156
Multi Drug Resistance Protein 1 ( <i>MDR1</i> ) (Varrella et al., 2014)	JQ793791	PI-MDR1_For PI-MDR1_Rev	GTCAAGGTACTCAATGGGGTTC CGGATGTCAATGCCATCAATC	158
Manganese Superossido Dismutasi ( <i>MnSOD</i> )* (Ragusa et al., 2017)	XM_786733	PI-SOD_For PI-SOD_Rev	CTCCGTTCTCAACCTGCTG CGCTGACTAAGCCAAACATATCC	n.d.
Glutazione Perossidasi ( <i>gpx</i> )* (Ragusa et al., 2017)	XM_787470	PI-GPX_For PI-GPX_Rev	ATACAGTACGCAGCACACCAGC AGAATCTCCGAGCCAGGTATG	n.d.
Toll-Like Receptor 4 ( <i>tir4</i> ) (Pinsino et al., 2015)	LK022847.1	PI-Tlr4_For PI-Tlr4_Rev	ACTGTGATTGGAGTGGTTTAT AGGATCAAAGTCAAGAAAGGGGTT	128
DNA-binding protein with twelve zn fingers ( <i>Z12-1</i> ) (Costa et al., 2012)	LT900344	PI-Z12-1_For PI-Z12-1_Rev	AGCGCCACACAAAAGAAGTC GGATGATAGACAGGGCTGTTTGA	93
ubiquitina ( <i>ubiquitin</i> ) (Romano et al., 2011)	M61772.1	PI-Ubiquitin_For PI-Ubiquitin_Rev	CACAGGCAAGACCATCACACTCGAGGTC GAGAGAGTGCAGCCATCCTCGAGTTGC	150
Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells ( <i>NF-kB</i> ) (Pinsino et al., 2015)	HE574572	PI-NF-kB_For PI-NF-kB_Rev	TCCCATGGAGGACTGCCGTGTCA TCGTTGGTTACCAAGGAGACCACA	116
heat shock protein 70 ( <i>hsp70</i> ) (Romano et al., 2011)	X61379	PI-hsp70_For PI-hsp70_Rev	CAGAACCACGCCAGCTATG GCTTGATGCTACTATCGTTG	150
heat shock protein 60 ( <i>hsp60</i> ) (Marrone et al., 2012)	AJ249625	PI-hsp60_For PI-hsp60_Rev	GAATATCCAGTGTACTCCGAC GCATCAGCTAAGAGGTCAAC	160
heat shock protein 56 ( <i>hsp56</i> ) (Marrone et al., 2012)	DQ464426	PI-hsp56_For PI-hsp56_Rev	GGAGCTATGCTAAGGACATC CTACAGCCTTAGCGACAGTG	183

catalytic domain of the protein kinase superfamily ( <i>p38 MAPK</i> ) (Pinsino et al., 2015)	LK022846	PI-p38 MAPK_For PI-p38 MAPK_Rev	TTCAGTCCAGAGGACTTCCATCA ATACTTGCCCATACGCTCCCGA	110
phosphatidylinositide 3-kinase ( <i>pi3k</i> ) (Chiaromonte et al., 2020)	MT786252	PI-pi3k_For PI-pi3k_Rev	GGCAAGATATGCTGACCCCTCC GGGTC TTGTATGGGATAATCCTC	n.d.
14-3-3 epsilon ( <i>14-3-3ε</i> ) (Marrone et al., 2012)	AJ493680	PI-14-3-3ε_For PI-14-3-3ε_Rev	TCAAGGCGTGCAGCATTGCATAC TTCTCGATCAATCCTCTGTAGT	146
jun-like domain ( <i>jun</i> ) (Pinsino et al., 2015)	HE817756	PI-Jun_For PI-Jun_Rev	GAGACTCAGTTCTACGAAGATTCA AGGCAAGCTTGAGCATCTGTACGT	139
C-Jun N-Terminal Kinase ( <i>jnk</i> ) (Ruocco et al., 2017)	KF442411.1	PI-JNK_For PI-JNK_Rev	GATCGTGATCTTCTCGGGAC CTGGCTTGTCACACATAG	186
Tank-Binding Kinase 1 ( <i>tbk1</i> ) (Chiaromonte et al., 2019)	MK229194.1	PI-tbk1_For PI-tbk1_Rev	ACACAAGGTATTAGAAGCACCAA AACTGCA ACAACATCTCCAGT	120

### 3.8 Analisi dell' espressione dei geni tramite Real-Time PCR

La *Real-Time PCR* o anche chiamata PCR quantitativa (qPCR) consente il rilevamento e la misurazione quantitativa dei prodotti generati durante ogni ciclo del processo di PCR (Pestana et al., 2010). Grazie alla sua sensibilità ed efficacia è una tecnica ampiamente utilizzata per la quantizzazione genica. Essa utilizza un marcatore del DNA, che produce fluorescenza durante la reazione, ed un sistema in grado di rilevarla. In questo caso è stata utilizzata la sostanza intercalante fluorescente SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). In soluzione il colorante non legato emette solo una debole fluorescenza che aumenta enormemente (più di 200 volte) quando si lega al solco minore della doppia elica del DNA. Nelle varie fasi della reazione di PCR lo strumento rileva gli aumenti di fluorescenza. Le misure di fluorescenza sono riportate in un grafico che mette in relazione i cicli di amplificazione e la fluorescenza emessa. Al valore di fluorescenza più basso, ma sufficiente a distinguere il segnale proveniente dai campioni dal segnale dovuto al fondo (background), viene fissato il valore soglia. Il ciclo di amplificazione al quale il tracciato di ogni campione intercetta la linea soglia (CP) definisce il ciclo soglia (Ct), che indica il numero dei cicli necessari affinché in ogni dato campione si raggiunga la stessa concentrazione di DNA. Il valore numerico del Ct è inversamente proporzionale alla quantità di amplicone presente nella reazione (cioè, più basso è il Ct, maggiore è la quantità di amplicone; Schmittgen & Livak, 2008).

Nella quantificazione relativa, vengono presentati i dati della PCR in tempo reale rispetto a un altro gene, spesso indicato come di riferimento (Schmittgen & Livak, 2008). Per determinare l'efficienza e la specificità dei primer, si utilizzano le curve standard, che vengono generate utilizzando diluizioni scalari di cDNA (1; 1:5; 1:10; 1:50 1:100; 1:250; 1:1000) (Bustin et al., 2009).

Le miscele di reazione, in un volume finale di 10  $\mu$ L, contengono: 1  $\mu$ L di cDNA, 5  $\mu$ l di SYBR Green, 0.3  $\mu$ L di una miscela della coppia di primer (0.3  $\mu$ M ciascuno) e 3.4  $\mu$ L di acqua. Le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) con il seguente profilo termico: fase iniziale di denaturazione a 95° C per 1 minuto, 39 cicli con: fase di denaturazione a 95° C per 15 sec e fase di annealing a 60° C per 30 secondi, e infine una fase per l'analisi della curva di melting (60° C a 95° C con un aumento di 0.5° C per secondo e con misura di fluorescenza). I dati sono stati analizzati con il programma Bio-Rad CFX Maestro. Sono state costruite le curve standard in cui i valori di Ct sono stati correlati con il logaritmo delle diluizioni del cDNA. Il coefficiente di correlazione deve essere vicino a 1, affinché la correlazione risulti significativa. Dalla pendenza della retta di correlazione (m) è stato calcolato il valore di efficienza secondo l'equazione:

$$\text{Efficienza} = 10^{-1/m}$$

Un valore di efficienza intorno a 2 sta ad indicare una reazione in cui ad ogni ciclo si raddoppia il numero di molecole presenti, rappresentando così una reazione ideale.

Per tutti gli esperimenti di Real-Time qPCR, le coppie di primer sono state utilizzate per misurare l'espressione genica sulle larve a 48 ore dopo la fecondazione, sia in condizioni normali che in presenza delle diverse creme solari, utilizzando le medesime miscele di reazione precedenti, ovvero 1  $\mu$ L di cDNA non diluito, 5  $\mu$ l di SYBR Green, 0.3  $\mu$ L di una miscela della coppia di primer (0.5  $\mu$ M ciascuno) e 3.4  $\mu$ L di acqua, raggiungendo un volume finale di 10 $\mu$ L. I valori di Ct e di efficienza ottenuti per ciascuna coppia di primer sono stati analizzati mediante il software Bio-Rad CFX Maestro, considerando *Pl-ubiquitina* e *Pl-z-12-1* come geni di riferimento. Il programma consente di valutare l'Espressione Relativa ( $\Delta$ Cq), data dalla seguente equazione:

$$\Delta Cq = \text{Efficienza}_{\text{gene target}}^{C(t) \text{ gene target} - C(t) \text{ gene di riferimento}}$$

I valori così ottenuti sono riportati sotto forma di istogramma e rappresentano i valori di espressione di ciascun gene di interesse nei diversi trattamenti considerati.

In seguito, per comprendere come varia l'espressione dei diversi geni in analisi rispetto al controllo, si calcola il  $\Delta\Delta Cq$ , dal quale si ottiene il Fold Change attraverso la formula:

$$2^{-\Delta\Delta Cq}$$

I valori di Fold Change, calcolati in forma logaritmica in base 2, sono stati poi rappresentati attraverso una Heatmap generata dal software Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/expression/>; Babicki et al., 2016). Il clustering è stato eseguito mediante il metodo dell'Average Linkage considerando le distanze euclidee.

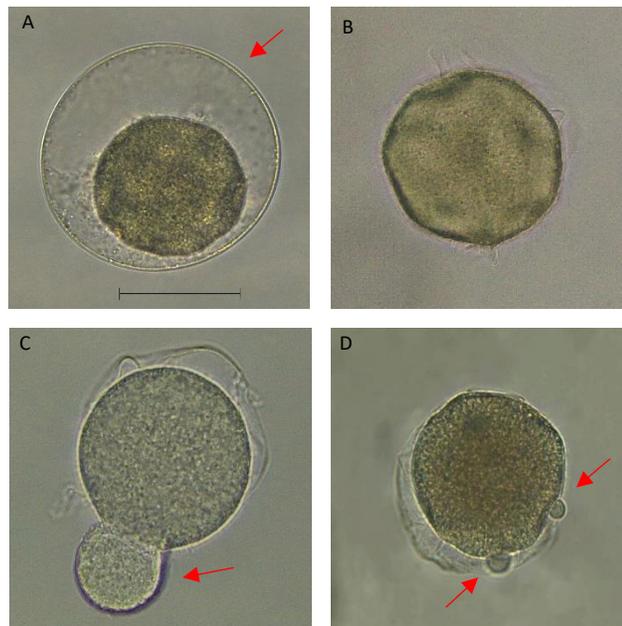
### 3.9 *Analisi statistiche*

Le analisi statistiche, relative all'analisi morfologica, sono state effettuate tramite GraphPad Prism versione 8.0.2 per Windows (GraphPad Software, San Diego California USA), utilizzando l'analisi di varianza ad una via (ONE-WAY ANOVA). Si è effettuata questa analisi per determinare se esiste una differenza statistica significativa tra i diversi trattamenti considerati e il controllo. A ciò fa seguito il test di confronto multiplo di Bonferroni, con il livello di significatività fissato a  $p < 0.05$ . Per quanto riguarda l'analisi statistica relativa alle analisi molecolari è stata eseguita utilizzando l'analisi di varianza ad una via (ONE-WAY ANOVA), seguita dal test di confronto multiplo di Bonferroni, con il *p-value* fissato a  $< 0.05$ .

## 4. Risultati

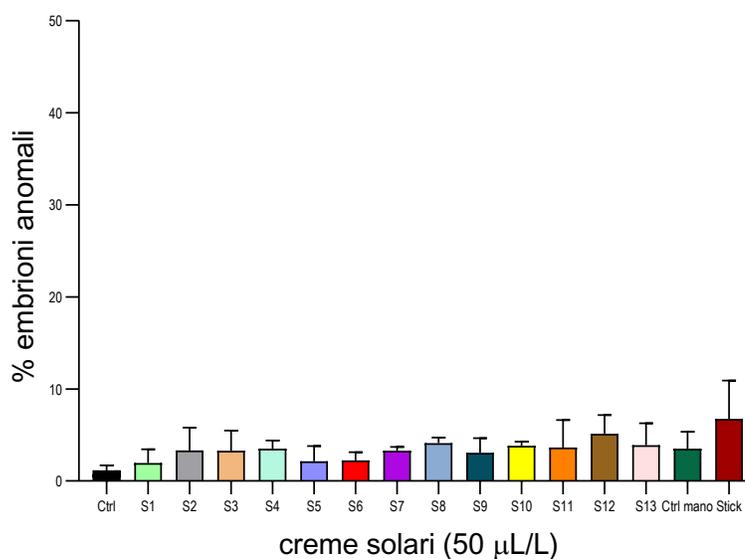
### 4.1 Analisi morfologica degli effetti delle creme solari sullo sviluppo embrionale del riccio di mare *P. lividus*

Le analisi condotte utilizzando 14 composti protettivi solari, oggetto di studio di questa tesi, per valutare le malformazioni indotte sugli embrioni di *P. lividus* hanno evidenziato, dopo 20 minuti di incubazione, diverse tipologie di anomalie rispetto agli embrioni sani (Figura 4.1 A). In particolare, sono stati osservati embrioni privi della membrana di fecondazione (Figura 4.1 B), caratterizzati da shock dato dalla penetrazione di spermatozoi (polispermia; Figura 4.1 C), mentre altri presentavano piccole vesciche lungo la propria superficie (Figura 4.1 D).



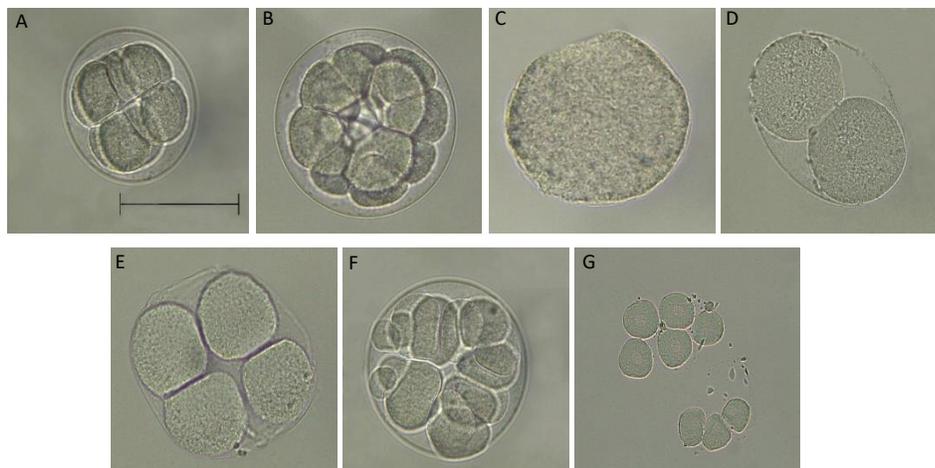
**Fig. 4.1:** Foto al microscopio ottico Leica ICC50 W (Leica Microsystems) con ingrandimento 40x di embrioni di *P. lividus* 20 minuti dopo la fecondazione (B-D) sono state aggiunte le creme solari (50  $\mu$ l/L) a confronto con il controllo (A; embrioni in acqua di mare senza creme). Scala: 50  $\mu$ m.

In particolare, nel grafico riportato in Figura 4.2 sono riportate le percentuali di embrioni anomali risultate per ciascun trattamento. Tutti i trattamenti hanno mostrato valori percentuali molto simili di anomalie compresi tra 1.95 % e 6.75% risultati rispettivamente dai trattamenti con la S1 e lo stick. Dai confronti tra trattati e controlli non si osservano differenze significative al T<sub>0</sub>.



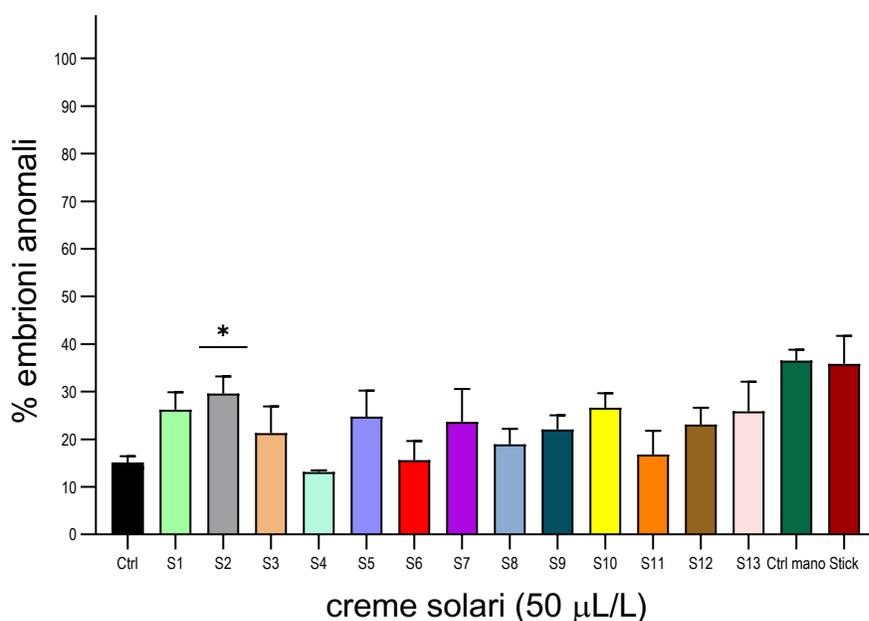
**Fig. 4.2:** Embrioni anomali (%) di *P. lividus* nei trattati e nei controlli dopo 20 minuti dalla fertilizzazione (T<sub>0</sub>).

Anche 3 ore dopo la fecondazione si evidenziano anomalie rispetto agli embrioni non incubati con le creme solari che presentano lo sviluppo di 8 o 16 cellule (Figura 4.3 A-B). Nello specifico, sono stati osservati embrioni caratterizzati da un ritardo nello sviluppo rispettivamente si trovano non ancora divisi (Figura 4.3 C), 2 (Figura 4.3 D) e 4 cellule (Figura 4.3 E), divisione asimmetrica tra i blastomeri (Figura 4.3 F) oppure privi di membrana con conseguente dispersione dei blastomeri (Figura 4.3 G).



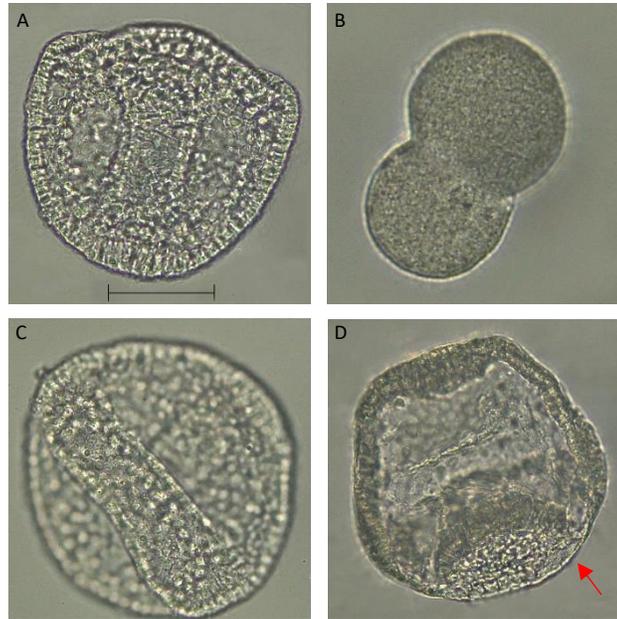
**Fig. 4.3:** Foto al microscopio ottico Leica ICC50 W (Leica Microsystems) con ingrandimento 40x di embrioni di *P. lividus* 3 ore dopo la fecondazione (B-G) sono state aggiunte le creme solari (50  $\mu\text{l/L}$ ) a confronto con il controllo (A; embrioni in acqua di mare senza creme). Scala: 50  $\mu\text{m}$ .

Nel grafico in Figura 4.4 è riportata la percentuale di embrioni anomali relativi a 3 ore post fecondazione ( $T_3$ ). Le percentuali delle anomalie embrionali osservate in tutti i trattamenti sono comprese tra 13.1 % (S4) e il 35.86% (Stick). Solo gli embrioni incubati con S2 mostrano un aumento significativo delle anomalie (29.6%) rispetto agli embrioni incubati in acqua di mare (15%;  $p < 0.05$ ).



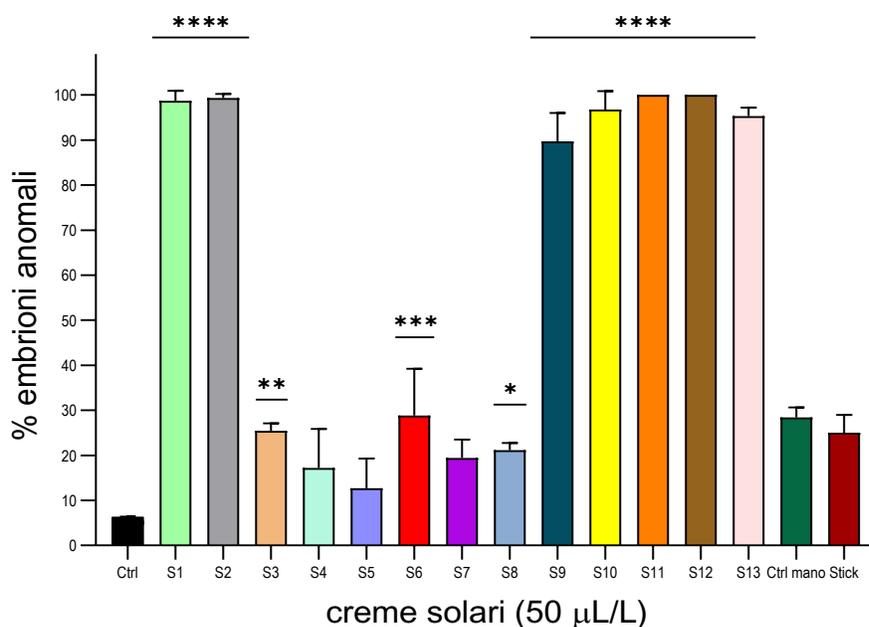
**Fig. 4.44:** Embrioni anomali (%) di *P. lividus* nei trattati e nei controlli dopo 3 ore dalla fecondazione ( $T_3$ ). (\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

Dopo 24 ore dalla fecondazione che corrisponde allo stadio di gastrula tardiva di *P. lividus*, sono state osservate diverse categorie di anomalie rispetto agli embrioni non incubati con le creme solari (Figura 4.5 A). In particolare, sono state identificate esogastrule (Figura 4.5 B), gastrule di forma irregolare a causa di una migrazione anomala del mesenchima primario (Figura 4.5 C) mentre altri presentano ritardo nello sviluppo in quanto si trovano nella fase di blastula con mesenchima primario (Figura 4.5 D).



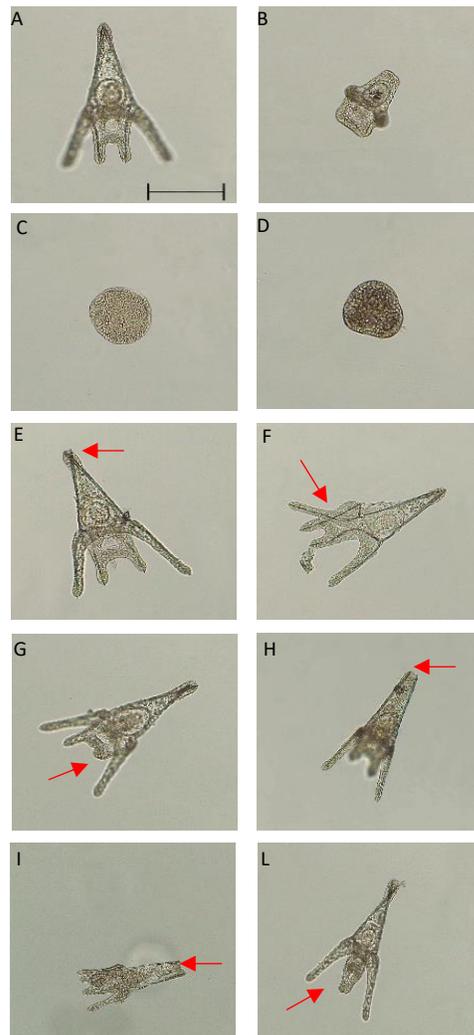
**Fig. 4.5:** Foto al microscopio ottico Leica ICC50 W (Leica Microsystems) con ingrandimento 40x di embrioni di *P. lividus* 24 ore dopo la fecondazione (B-D) sono state aggiunte le creme solari (50  $\mu$ l/L) a confronto con il controllo (A; embrioni in acqua di mare senza creme). Scala: 50  $\mu$ m.

In particolare, nel grafico riportato in Figura 4.6 sono raffigurate le percentuali di embrioni anomali osservati dopo 24 ore dalla fecondazione. Nei trattamenti, gli impatti maggiori sono stati osservati con i trattamenti S11 e S12 ( $p < 0.0001$ ), con il 100% di malformazioni. In ordine decrescente, il trattamento S2 registra una percentuale pari a 99.3 ( $p < 0.0001$ ), S1 a 98.7 % ( $p < 0.0001$ ), S10 a 96.76 % ( $p < 0.0001$ ), S13 a 95.31 ( $p < 0.0001$ ) e infine S9 a 89.72% ( $p < 0.0001$ ). Nei trattati S3 e S6, la percentuale di embrioni anomali raggiunge valori significativi rispettivamente di 25.44 e 28.84% rispetto al controllo ( $p < 0.001$ ), così come in S8 dove si osservano il 21.13 % delle anomalie dopo 24 ore di sviluppo ( $p < 0.05$ , Fig. 4.6).



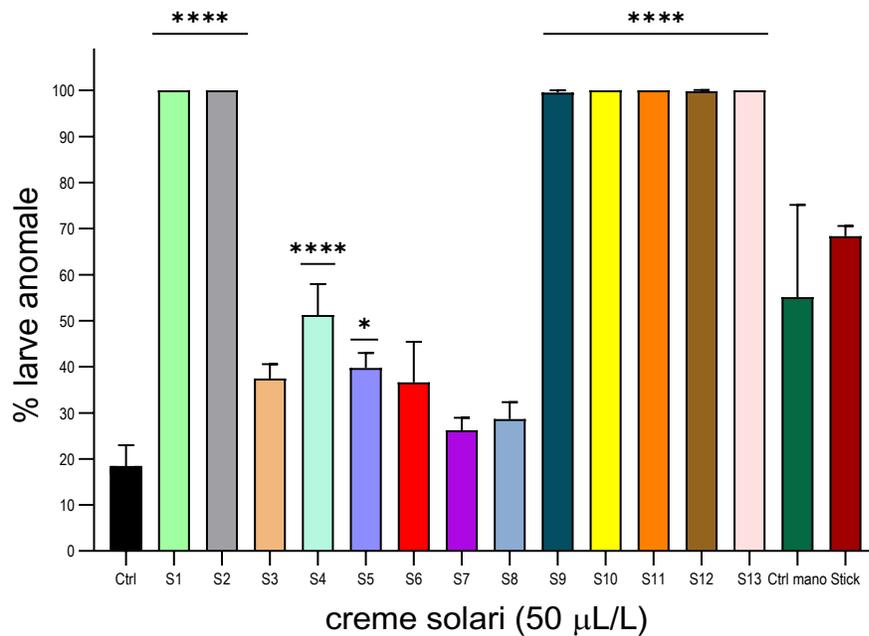
**Fig. 4.6:** Embrioni anomali (%) di *P. lividus* nei trattati e nei controlli dopo 24 ore dalla fertilizzazione ( $T_{24}$ ). (\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p < 0.05$ ); (\*\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p < 0.01$ ); (\*\*\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p < 0.001$ ); (\*\*\*\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p < 0.0001$ ).

Nella fase di sviluppo larvale, 48 ore dopo la fecondazione, sono state rilevate diverse tipologie di anomalie della struttura scheletrica rispetto alle larve (o plutei) non esposte alle creme solari (Figura 4.7 A). Nello specifico, sono stati osservati pro-plutei (ritardo nello sviluppo; Figura 4.7 B), embrioni bloccati che non hanno raggiunto lo stadio di pluteo (Figura 4.7 C) e bloccati al tempo T<sub>24</sub> (Figura 4.7 D), plutei dall'apice incrociato (Figura 4.7 E), plutei dalla forma irregolare con un braccio piegato (Figura 4.7 F), plutei con braccia mancanti (Figura 4.7 G), plutei caratterizzati dall'apice dello scheletro separato (Figura 4.7 H-I) ed infine plutei con braccia posteriori unite (Figura 4.7 L).



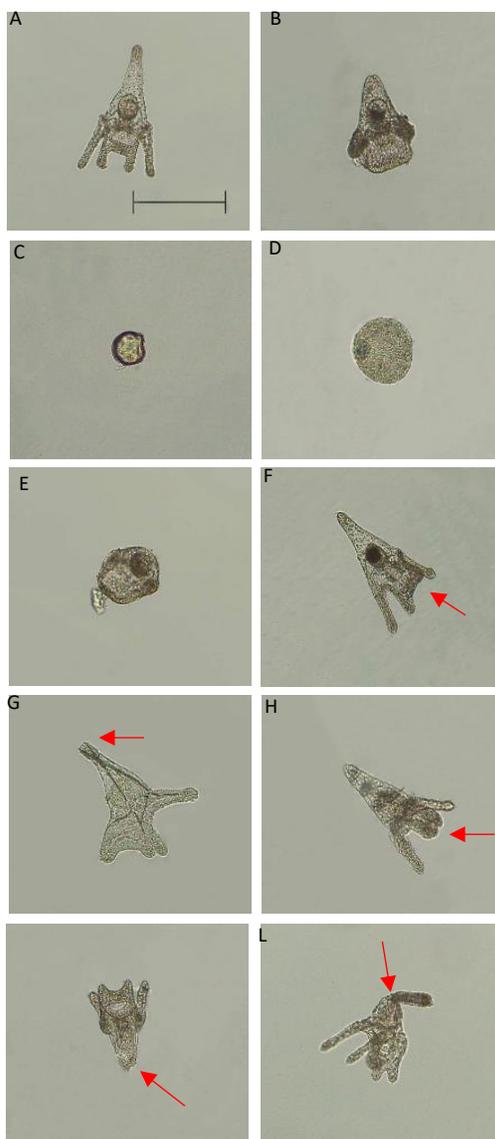
**Fig. 4.7:** Foto al microscopio ottico Leica ICC50 W (Leica Microsystems) con ingrandimento 10x di larve di *P. lividus* 48 ore dopo la fecondazione (B-D) sono state aggiunte le creme solari (50  $\mu$ l/L) a confronto con il controllo (A; embrioni in acqua di mare senza creme). Scala: 100  $\mu$ m.

Nel dettaglio, nel grafico riportato in Figura 4.8 sono rappresentate le percentuali di larve anomale osservate dopo 48 ore dalla fecondazione. L'esposizione dei plutei di *P. lividus* alle creme solari S1, S2, S9, S10, S11, S12 e S13 ha provocato una percentuale di anomalie comprese tra 99.5 e 100% ( $p$ -value <0.0001). Anche le anomalie riscontrate nei plutei incubati con S4 e S5 sono risultate più elevate, con valori di 51.2 % e 39.7 %, rispetto a quelli incubati senza creme (18.4%) ( $p$ <0.0001 per S4;  $p$ <0.05 per S5).



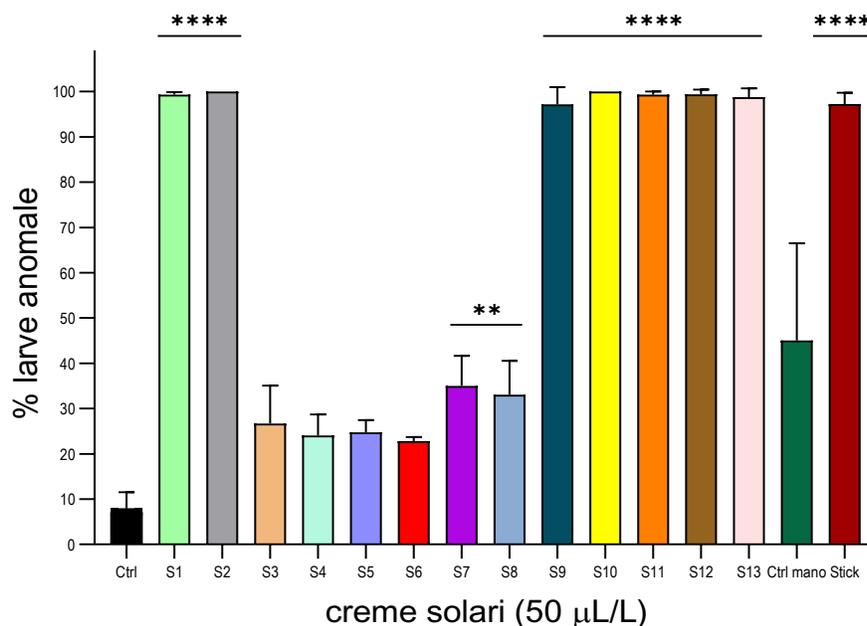
**Fig. 4.8:** Larve anomale (%) di *P. lividus* nei trattati e nei controlli dopo 48 ore dalla fertilizzazione ( $T_{48}$ ). (\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p$ <0.05); (\*\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p$ <0.01); (\*\*\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p$ <0.001); (\*\*\*\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p$ <0.0001).

Dopo 72 ore dalla fecondazione sono state riscontrate diverse anomalie nello sviluppo delle larve (Figura 4.9). In particolare sono stati osservati pro-plutei (ritardo dello sviluppo; Figura 4.9 B), embrioni bloccati in diversi tempi di sviluppo fra T<sub>0</sub> e T<sub>24</sub> (Figura 4.9 C-E), plutei con braccia mancanti (Figura 4.9 F), plutei dall'apice incrociato (Figura 4.9 G), plutei caratterizzati dalle braccia posteriori unite (Figura 4.9 H), plutei dall'apice separato (Figura 4.9 I) mentre altri di forma irregolare con la parte superiore piegata (Figura 4.9 L).



**Fig. 4.9:** Foto al microscopio ottico Leica ICC50 W (Leica Microsystems) con ingrandimento 10x di larve di *P. lividus* 72 ore dopo la fecondazione (B-D) sono state aggiunte le creme solari (50  $\mu$ l/L) a confronto con il controllo (A; embrioni in acqua di mare senza creme). Scala: 100  $\mu$ m.

In particolare, nel grafico riportato in Figura 4.10 sono illustrate le percentuali di larve anomale risultate per ciascun trattamento confrontati con le larve incubate in acqua di mare. I principali impatti, sono stati riscontrati in S1, S2, S9, S10, S11, S12, S13 e Stick con percentuali comprese tra il 97 e il 100% ( $p\text{-value} < 0.0001$ ). Le percentuali di anomalie riscontrate nelle larve incubate con S7 e S8 sono risultate più elevate rispetto al controllo (7.9%) con valori rispettivamente del 35 e 33% ( $p < 0.01$ ).



**Fig. 4.10:** Larve anomale (%) di *P. lividus* nei trattati e nei controlli dopo 72 ore dalla fertilizzazione ( $T_{72}$ ). (\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p < 0.05$ ); (\*\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p < 0.01$ ); (\*\*\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p < 0.001$ ); (\*\*\*\*) indica le differenze significative rispetto ai valori di controllo (ANOVA,  $p < 0.0001$ ).

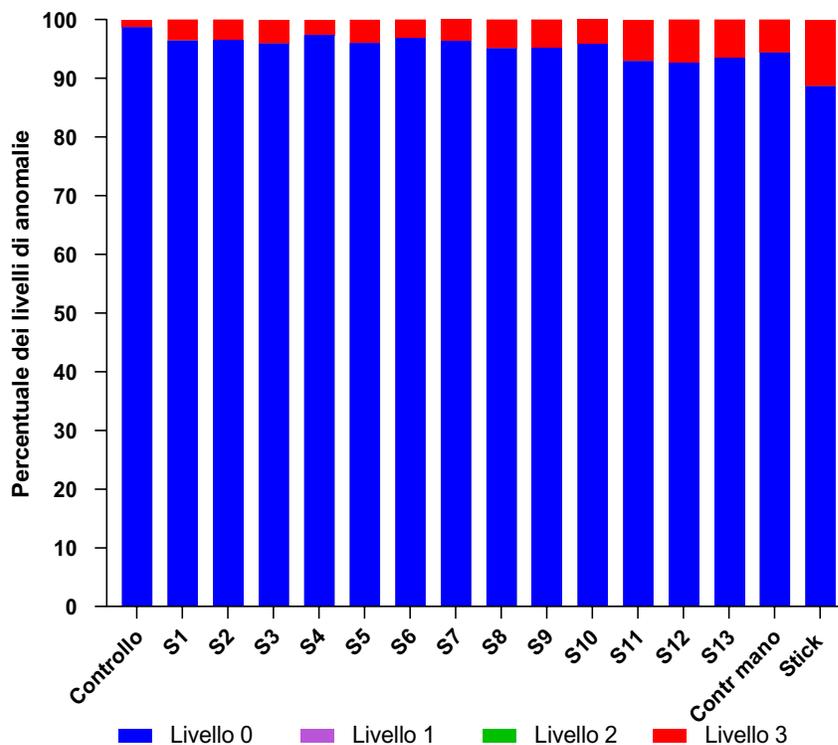
## 4.2 Index of sunscreen impact (ISI)

La suddivisione delle anomalie in 4 livelli di alterazione embrionale e larvale risultate dai trattamenti con le creme solari ha permesso di calcolare il valore di ISI nei diversi tempi di sviluppo analizzati e di definire il grado di impatto ambientale (Tab da 4.2 a Tab 4.6). I diversi livelli di anomalie sono stati determinati sulla base della classificazione di Gambardella et al., (2021) e riportati in Tabella 4.1.

**Tab. 4.1:** Tipologie di anomalie identificate e valore di tossicità assegnato ad esse.

<b>Tipologia di anomalia</b>	<b>Valore tossicità</b>
Sane	0
Uova non fecondate	3
Shock da penetrazione spermatozoo	3
Blebs	3
Divisione asimmetrica/anomala	3
Ritardo dello sviluppo (a 1,2,4 cellule)	2
Membrana assente	3
Esogastrula	3
Forma irregolare	1
Ritardo dello sviluppo per 24 ore	2
Ritardo dello sviluppo (larve)	1
Apice incrociato	1
Apice separato	1
Braccia fuse	1
Apice piegato	2
Braccia mancanti o ridotte	1
Non sviluppate-bloccati T0	3
Non sviluppate-bloccati T24	3

Al tempo 0, ovvero 20 minuti dopo l'inizio della fecondazione, in Fig. 4.11 si osserva la presenza di anomalie più gravi di livello 3 (assenza di membrana, shock e bleb) più abbondanti nel trattamento con la crema Stick (11.4 %). La maggioranza degli embrioni osservati non presentava anomalie (livello 0).



**Fig. 4.11:** Percentuale dei livelli delle anomalie morfologiche al T<sub>0</sub> negli embrioni di *Paracentrotus lividus* secondo l'Indice ISI.

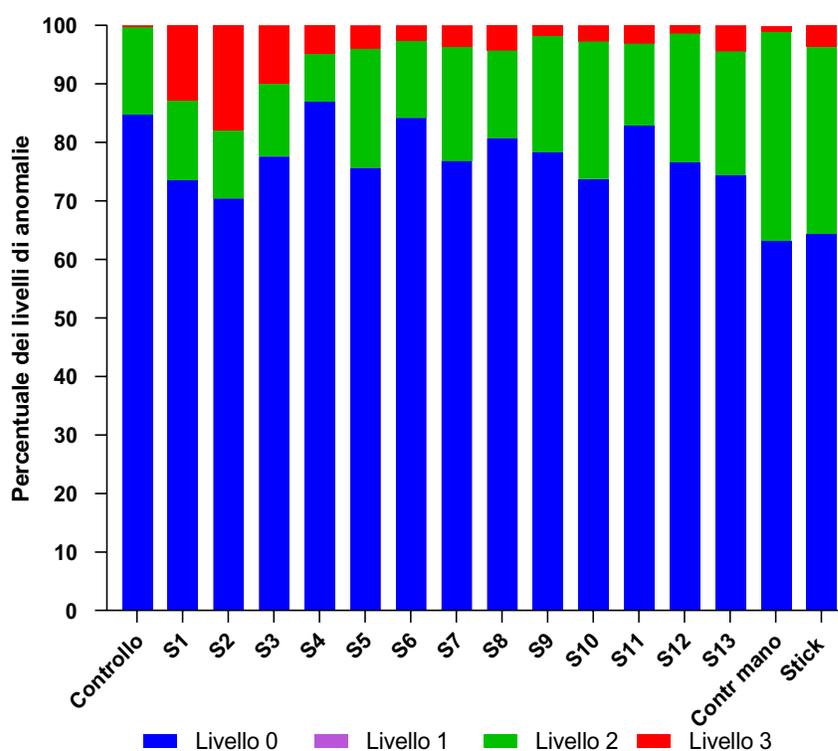
Come si può osservare in Tab. 4.2, i valori di ISI sono compresi tra 0 ed 1, pertanto, sulla base della Tab. 3.1 del capitolo 3, è stato osservato un impatto ambientale lieve per tutti i trattamenti.

**Tab. 4.2:** Percentuali di embrioni anomali e relativo impatto ambientale dei diversi trattamenti al tempo T<sub>0</sub>.

<b>Trattamento</b>	<b>Livello di alterazione embrionale</b>	<b>Embrioni anomali (%)</b>	<b>ISI</b>	<b>Impatto ambientale</b>
S1	0	96,43	0,11	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	3,57		
S2	0	96,56	0,10	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	3,44		
S3	0	95,91	0,12	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	4,09		
S4	0	97,36	0,08	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	2,64		
S5	0	96,04	0,12	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	3,96		
S6	0	96,	0,09	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	3,12		
S7	0	96,37	0,11	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	3,63		
S8	0	95,09	0,15	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	4,91		
S9	0	95,21	0,14	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	4,78		

S10	0	95,89	0,12	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	4,11		
S11	0	92,94	0,21	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	7,06		
S12	0	92,60	0,22	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	7,40		
S13	0	93,38	0,20	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	6,62		
Contr mano	0	94,38	0,17	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	5,62		
Stick	0	88,63	0,34	Lieve
	1	0		
	2	0		
	3	11,37		

Dopo 3 ore di esposizione ( $T_3$ ), si osserva la presenza di tre livelli di anomalie, tra cui il livello 0, rappresentato da embrioni in divisione ad 8 o a 16 cellule (sani) con una percentuale nei diversi trattamenti compresa tra il 64 e l'85%; il livello 2 (in verde), con il valore più elevato nello Stick (32%); livello 3, risultato maggiormente presente nel trattamento con S2 (18%) (Fig. 4.12).



**Fig. 4.12:** Percentuale dei livelli delle anomalie morfologiche al  $T_3$  negli embrioni di *P. lividus* secondo l'Indice ISI

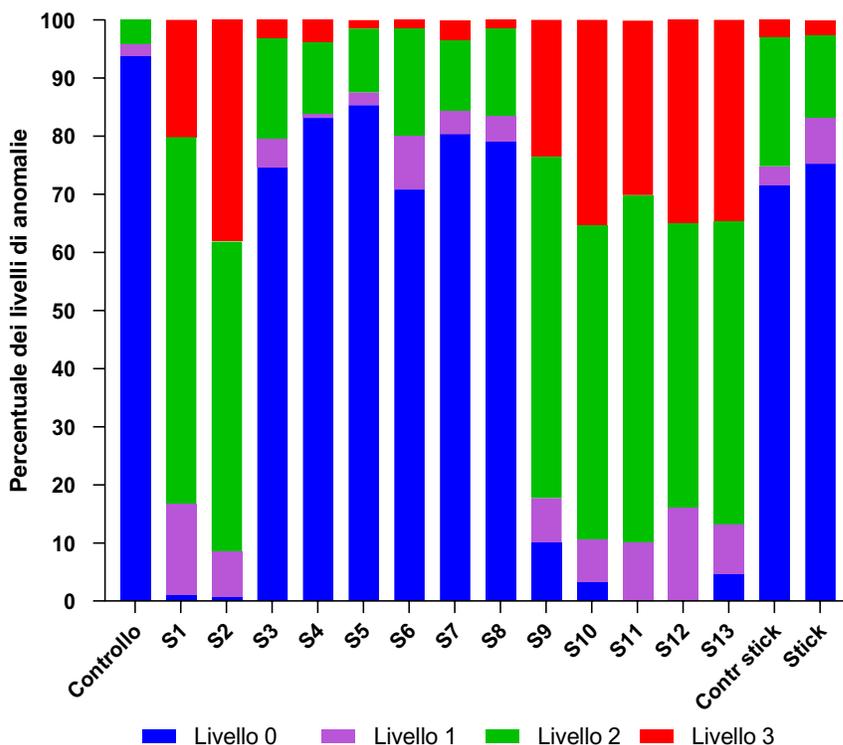
Come si può osservare in Tab. 4.3, i valori di ISI in tutti i trattamenti sono compresi tra 0 ed 1 e pertanto queste creme dopo 3 ore di incubazione determinano un impatto ambientale lieve su *P. lividus*.

**Tab. 4.3:** Percentuali di embrioni anomali e relativo impatto ambientale dei diversi trattamenti al tempo T<sub>3</sub>.

<b>Trattamento</b>	<b>Livello di alterazione embrionale</b>	<b>Embrioni anomali (%)</b>	<b>ISI</b>	<b>Impatto ambientale</b>
S1	0	73,52	0,66	Lieve
	1	0		
	2	13,50		
	3	12,98		
S2	0	70,38	0,77	Lieve
	1	0		
	2	11,63		
	3	17,99		
S3	0	77,57	0,55	Lieve
	1	0		
	2	12,38		
	3	10,05		
S4	0	86,90	0,31	Lieve
	1	0		
	2	8,28		
	3	4,82		
S5	0	75,61	0,53	Lieve
	1	0		
	2	20,34		
	3	4,04		
S6	0	84,16	0,34	Lieve
	1	0		
	2	13,09		
	3	2,75		
S7	0	76,76	0,50	Lieve
	1	0		
	2	19,46		
	3	3,77		
S8	0	80,69	0,43	Lieve
	1	0		
	2	15,03		
	3	4,28		
S9	0	78,32	0,45	Lieve
	1	0		
	2	19,80		
	3	1,88		
S10	0	73,72	0,55	Lieve
	1	0		

	2	23,51		
	3	2,77		
S11	0	82,78	0,38	Lieve
	1	0		
	2	14,10		
	3	3,12		
S12	0	76,49	0,48	Lieve
	1	0		
	2	22,10		
	3	1,41		
S13	0	74,31	0,56	Lieve
	1	0		
	2	21,23		
	3	4,45		
Contr mano	0	63,16	0,74	Lieve
	1	0		
	2	35,73		
	3	1		
Stick	0	64,29	0,75	Lieve
	1	0		
	2	31,99		
	3	3,71		

Dopo 24 ore dalla fecondazione, si riscontrano tutti i diversi livelli di alterazioni esistenti (Fig. 4.13). Il livello 0 (embrioni sani) risulta essere poco presente nei trattamenti con S1 (1%), S2 (0.63%), S9 (10%), S10 (3.2%) e S13 (4.5%), mentre risulta assente in S11 e S12. Il livello 1 è più abbondante in S12 con una percentuale pari al 16%. Le percentuali più elevate del livello 2 sono state ritrovate negli embrioni trattati con S1 (63%), e S2 (53.3%) e da S9 a S13 con valori compresi tra 48.9 (S12) e 59.8 (S11) %. Infine, il livello 3 è più abbondante a negli embrioni esposti alla crema S2 (38.1%).



**Fig. 4.13:** Percentuale dei livelli delle anomalie morfologiche al T<sub>24</sub> negli embrioni di *P. lividus* secondo l'Indice ISI.

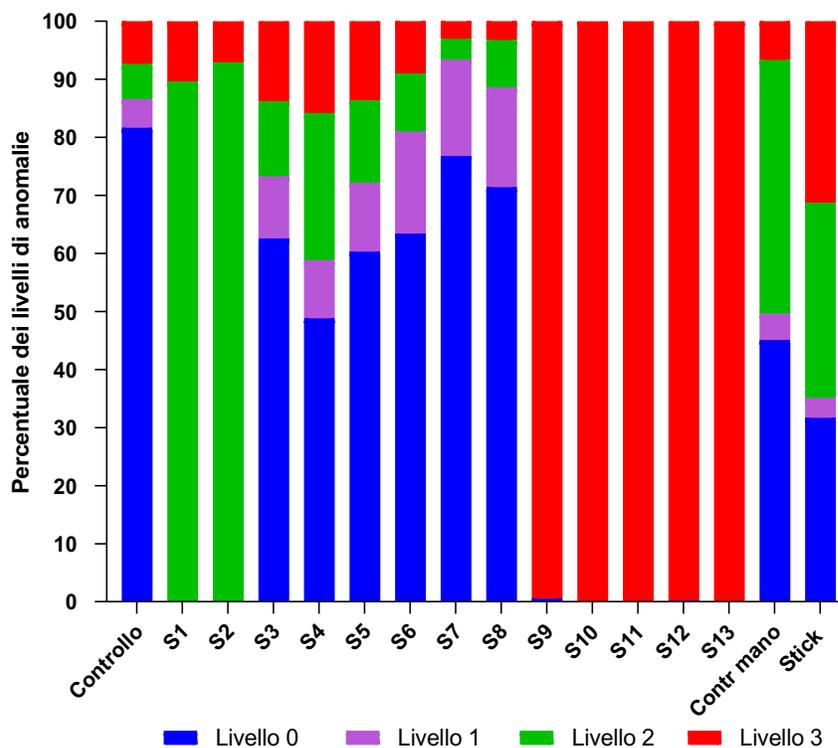
Nella tabella 4.4 sono riportati i valori di ISI e di impatto ambientale: da S3 a S8 e nello Stick, i valori di ISI sono minori di 1 con un impatto ambientale lieve. Il trattamento con S9 determina un impatto ambientale moderato con ISI 2,98; mentre per S1, S2, S10, S11, S12 e S13, i valori di ISI sono maggiori di 2 e l'impatto ambientale è elevato.

**Tab. 4.4:** Percentuali di embrioni anomali e relativo impatto ambientale dei diversi trattamenti al tempo T<sub>24</sub>.

<b>Trattamento</b>	<b>Livello di alterazione embrionale</b>	<b>Embrioni anomali (%)</b>	<b>ISI</b>	<b>Impatto ambientale</b>
S1	0	1,04	2,02	Elevato
	1	15,7		
	2	63,1		
	3	20,17		
S2	0	0,63	2,29	Elevato
	1	7,9		
	2	53,32		
	3	38,15		
S3	0	74,61	0,49	Lieve
	1	4,86		
	2	17,33		
	3	3,2		
S4	0	83,16	0,37	Lieve
	1	0,61		
	2	12,37		
	3	3,85		
S5	0	85,35	0,28	Lieve
	1	2,18		
	2	11,01		
	3	1,45		
S6	0	70,85	0,50	Lieve
	1	9,14		
	2	18,57		
	3	1,42		
S7	0	80,34	0,39	Lieve
	1	4,01		
	2	12,05		
	3	3,58		
S8	0	78,9	0,39	Lieve
	1	4,48		
	2	15,19		
	3	1,42		
S9	0	10	1,96	Moderato
	1	7,73		
	2	58,75		
	3	23,52		

S10	0	3,26	2,21	Elevato
	1	7,33		
	2	54,02		
	3	35,39		
S11	0	0	2,20	Elevato
	1	10,01		
	2	59,85		
	3	30,04		
S12	0	0	2,19	Elevato
	1	16,03		
	2	48,95		
	3	35,018		
S13	0	4,54	2,17	Elevato
	1	8,60		
	2	52,21		
	3	34,65		
Contr mano	0	71,41	0,57	Lieve
	1	3,43		
	2	22,24		
	3	2,92		
Stick	0	75,22	0,44	Lieve
	1	7,96		
	2	14,05		
	3	2,76		

In Fig. 4.14 sono rappresentati i diversi livelli di anomalie osservati nelle larve ( $T_{48}$ ). Il livello 0, che comprende larve senza anomalie, è assente in alcuni trattamenti, in particolare in S1, S2, S10, S11 e S13 mentre presenta percentuali  $<1\%$  in S9 e S12. Il livello 1, è risultato più abbondante nelle larve trattate con S6 (17.5%) e S8 (17.1%). Il livello 2 è maggiormente presente in S2 con una percentuale di anomalie del 93%. I valori del livello 3 di circa il 100% sono stati riscontrati nelle creme da S9 a S13.



**Fig. 4.14:** Percentuale dei livelli delle anomalie morfologiche al  $T_{48}$  nelle larve di *P. lividus* secondo l'Indice ISL.

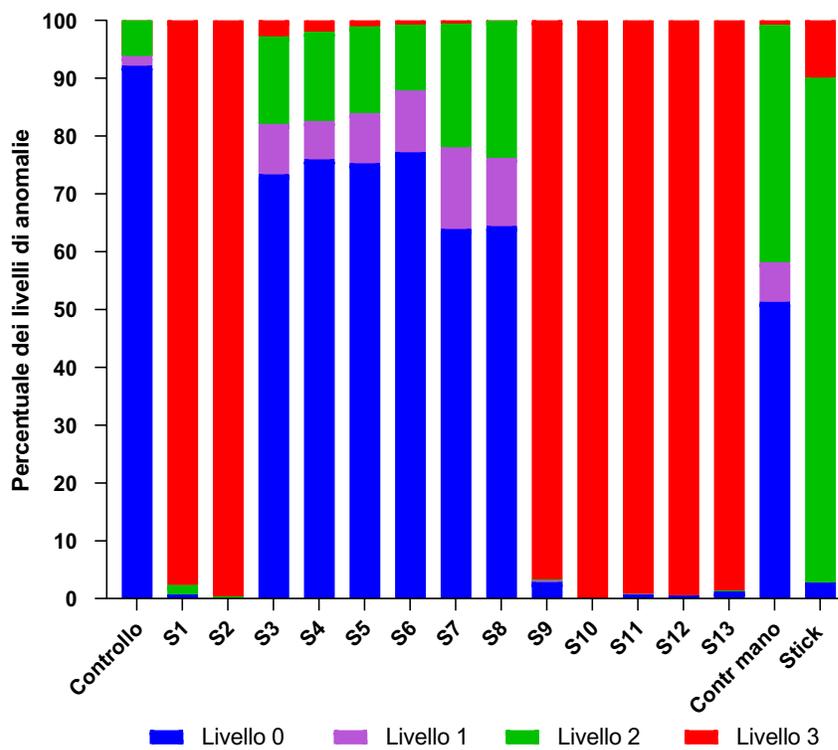
L'impatto ambientale risultante è risultato più basso in S3, S5, S6, S7, S8 (Tab. 4.5). I trattamenti con S4 e Stick hanno provocato un impatto moderato mentre invece è elevato nelle larve esposte con S1, S2 e da S9 a S13. In particolare, in S1 e S2 le anomalie ricadono negli ultimi due livelli mentre da S9 a S13 è stato osservato unicamente il livello 3.

**Tab. 4.5:** Percentuali di larve anomale e relativo impatto ambientale dei diversi trattamenti al tempo T<sub>48</sub>.

Trattamento	Livello di alterazione larvale	Larve anomale (%)	ISI	Impatto ambientale
S1	0	0	2,10	Elevato
	1	0		
	2	89,60		
	3	10,40		
S2	0	0	2,07	Elevato
	1	0		
	2	92,90		
	3	7,096		
S3	0	62,56	0,78	Lieve
	1	10,67		
	2	12,97		
	3	13,79		
S4	0	48,76	1,08	Moderato
	1	10,08		
	2	25,29		
	3	15,87		
S5	0	60,30	0,81	Lieve
	1	11,86		
	2	14,17		
	3	13,67		
S6	0	63,38	0,65	Lieve
	1	17,57		
	2	10,02		
	3	9,03		
S7	0	76,74	0,33	Lieve
	1	16,64		
	2	3,56		
	3	3,06		
S8	0	71,36	0,43	Lieve
	1	17,18		
	2	8,18		
	3	3,27		
S9	0	0,49	2,98	Elevato
	1	0		
	2	0		

	3	99,51		
S10	0	0	3	Elevato
	1	0		
	2	0		
	3	100		
S11	0	0	3	Elevato
	1	0		
	2	0		
	3	100		
S12	0	0,16	2,99	Elevato
	1	0		
	2	0		
	3	99,83		
S13	0	0	3	Elevato
	1	0		
	2	0		
	3	100		
Contr mano	0	45,02	1,12	Moderato
	1	4,57		
	2	43,72		
	3	6,69		
Stick	0	31,64	1,65	Moderato
	1	3,44		
	2	33,61		
	3	31,31		

Infine, al tempo  $T_{72}$ , il livello 0 risulta essere completamente assente in S2 e S10 oppure poco rappresentato in S1, S9, S11, S12, S13 e Stick (Fig. 4.15). Larve con malformazioni di livello 1 sono risultate più abbondanti nei trattamenti con S8 (11.8%) mentre le larve con anomalie di livello 2 sono state rilevate dopo l'esposizione allo Stick (87.3%). Il livello 3, è risultato più abbondante negli embrioni trattati con le creme S1, S2, S9, S10 S11, S12 e S13 con valori compresi tra 96 al 100 %.



**Fig. 4.15:** Percentuale dei livelli delle anomalie morfologiche al  $T_{72}$  nelle larve di *P. lividus* secondo l'Indice ISI.

L'ISI risultante (Tab. 4.6) mostra i valori più elevati in S1, S2, S9, S10, S11, S12, S13 e Stick (compresi tra 2 e 3) che coincide con un impatto ambientale elevato. A partire da S3 fino a S8 vi è un ISI compreso tra 0 e 1, pertanto vi è un impatto ambientale lieve.

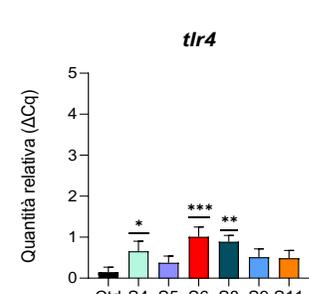
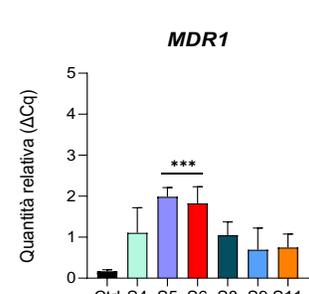
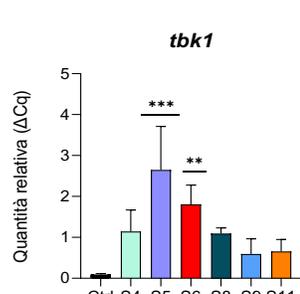
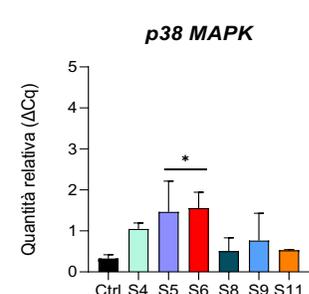
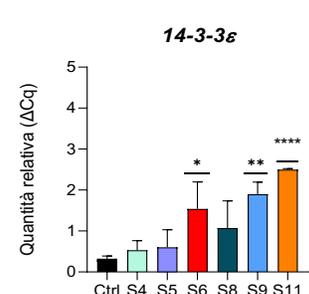
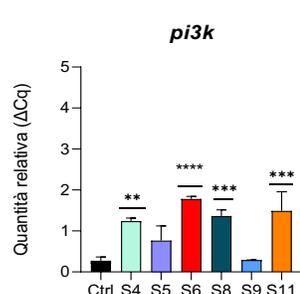
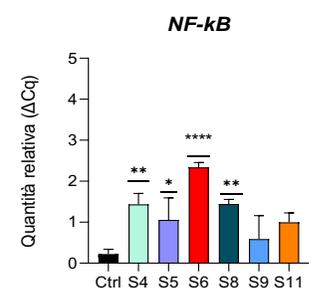
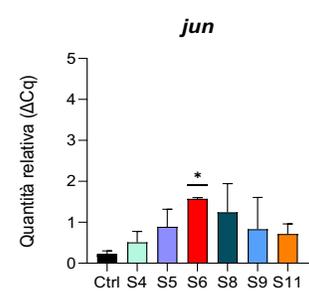
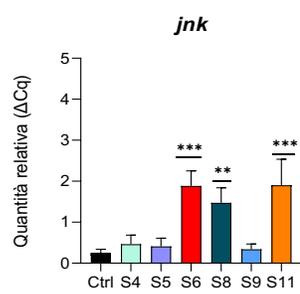
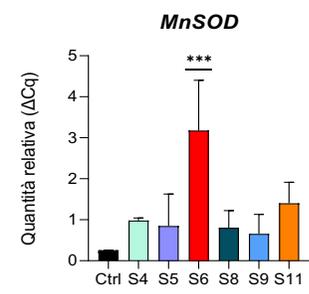
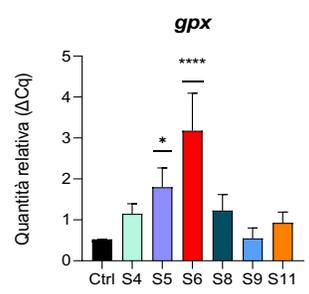
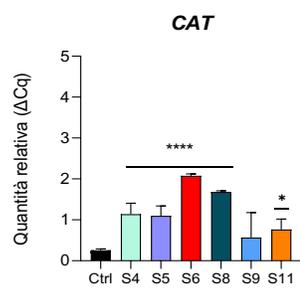
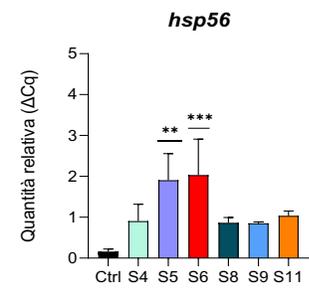
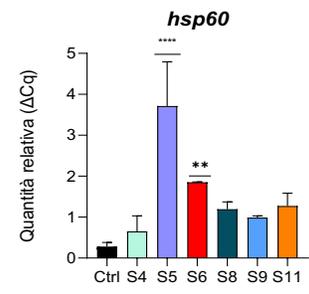
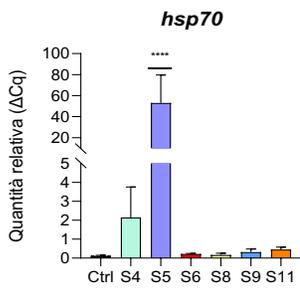
**Tab. 4.6:** Percentuali di larve anomale e relativo impatto ambientale dei diversi trattamenti al tempo T<sub>72</sub>.

Trattamento	Livello di alterazione larvale	Larve anomale (%)	ISI	Impatto ambientale
S1	0	0,65	2,96	Elevato
	1	0		
	2	1,63		
	3	97,72		
S2	0	0	2,99	Elevato
	1	0		
	2	0,33		
	3	99,67		
S3	0	73,33	0,47	Lieve
	1	8,72		
	2	15,14		
	3	2,80		
S4	0	75,94	0,43	Lieve
	1	6,63		
	2	15,47		
	3	1,96		
S5	0	75,23	0,42	Lieve
	1	8,70		
	2	15,01		
	3	1,07		
S6	0	77,16	0,36	Lieve
	1	10,68		
	2	11,42		
	3	0,74		
S7	0	63,87	0,59	Lieve
	1	14,16		
	2	21,40		
	3	0,58		
S8	0	64,37	0,59	Lieve
	1	11,82		
	2	23,72		
	3	0,09		
S9	0	2,79	2,91	Elevato

	1	0,33		
	2	0,16		
	3	96,72		
S10	0	0	3	Elevato
	1	0		
	2	0		
	3	100		
S11	0	0,65	2,98	Elevato
	1	0,08		
	2	0		
	3	99,27		
S12	0	0,47	2,98	Elevato
	1	0,07		
	2	0		
	3	99,47		
S13	0	1,23	2,96	Elevato
	1	0		
	2	0,16		
	3	98,61		
Contr mano	0	51,29	0,91	Lieve
	1	6,87		
	2	41,03		
	3	0,80		
Stick	0	2,71	2,04	Elevato
	1	0		
	2	87,36		
	3	9,93		

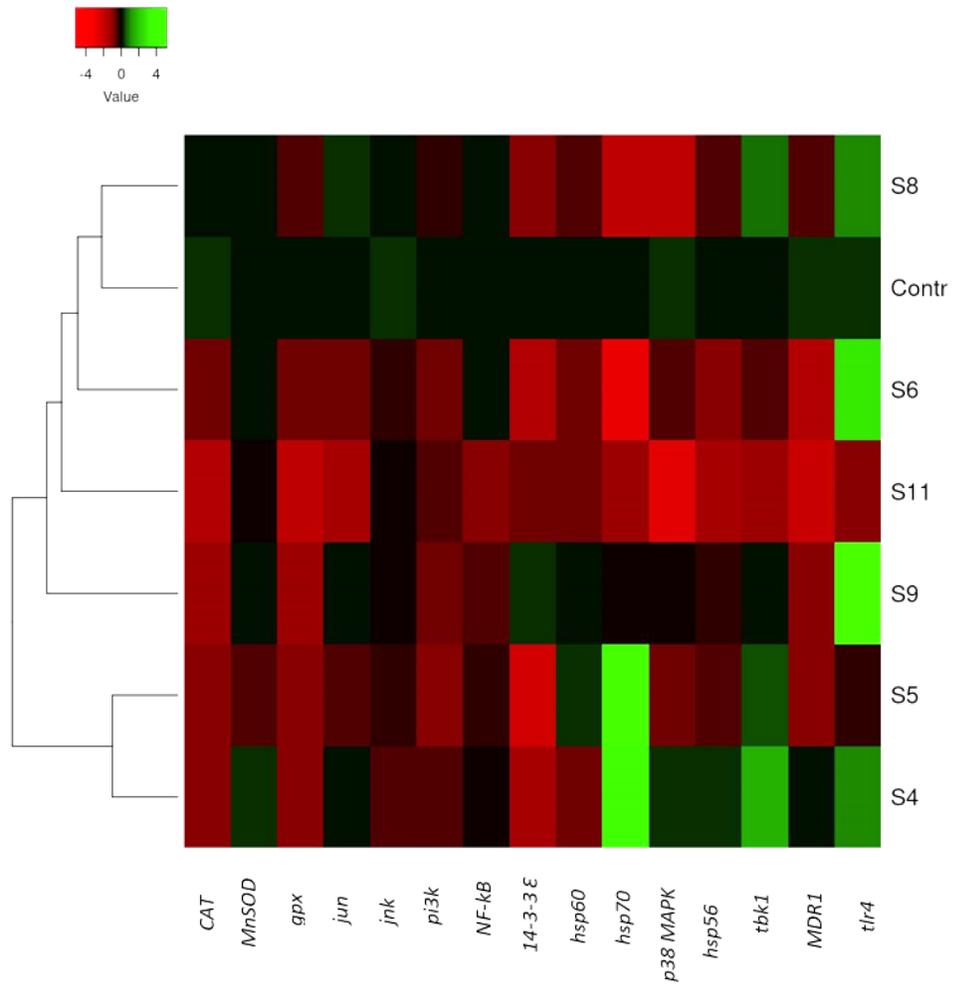
### 4.3 *Variazione dell'espressione genica nelle larve di P. lividus in risposta al trattamento con le creme solari*

Al fine di comprendere meglio gli effetti delle creme S4, S5, S6, S8, S9 e S11 con ISI compreso tra 1 e 3, livello molecolare sono stati effettuati esperimenti di Real-Time qPCR, per valutare la variazione dell'espressione genica di quindici geni di stress sulle larve di *P. lividus* dopo 48 ore dalla fecondazione. La Fig. 4.16 rappresenta i valori di quantità relativa ( $\Delta Cq$ ) dei 15 geni analizzati rispetto al controllo, rappresentato da larve in acqua di mare senza creme solari. Si osserva che tutti i trattamenti considerati mostrano livelli più elevati rispetto al controllo. In particolare, il livello di espressione del gene *hsp70* è significativamente più elevato rispetto al controllo nei plutei trattati con S5 ( $p < 0,0001$ ). L'esposizione dei plutei di *P. lividus* alle creme S5 e S6 mostrano 8 geni bersaglio comuni (*hsp60*, *hsp56*, *CAT*, *gpx*, *NF-kB*, *p38 MAPK*, *tbk1* e *MDR1*), rispetto al controllo con valori di *p-value* almeno minori di 0.05. Solo il trattamento S6 ha determinato cambiamenti dell'espressione di *MnSOD* ( $p < 0,001$ ) e *jun* ( $p < 0,05$ ). L'espressione del gene *CAT* è risultata più alta anche nelle larve esposte con le creme solari S4, S8 e S11 rispetto al controllo (S4, S8  $p < 0,0001$ ; S11  $p < 0,05$ ). I trattamenti con S6, S8 e S11 inducono la variazione dell'espressione genica di *jnk* rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ). Il trattamento con S4, S8 ha anche influenzato il gene *NF-kB* nei plutei con valori significativamente differenti rispetto al controllo (S4, S8  $p < 0,01$ ). Inoltre, anche l'espressione del gene *pi3k* è risultata modulata dalle seguenti creme solari: S4, S6, S8, S11 ( $p < 0,001$ ). L'espressione dei geni *14-3-3 E* e *tlr4* è risultata differente quando le larve venivano esposte con diverse creme solari rispetto al controllo. In particolare, i trattamenti che inducono un cambiamento di espressione per il gene *14-3-3 E* sono S6, S9, S11 ( $p < 0,05$ ), mentre per il gene *tlr4* sono S4, S6, S8 ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 4.16:** Valori di Quantità relativa ( $\Delta Cq$ ) per ciascun gene analizzato rispetto ai controlli e normalizzati per i geni di riferimento *Pl-Ubiquitina* e *Pl-Z-12-1*. Valori di *p-value* <0.05 sono indicati con \*; valori <0.01 con \*\*; valori <0.001 con \*\*\*; valori <0.0001 con \*\*\*\*.

La Figura 4.17 rappresenta la Heatmap, ottenuta considerando i valori di Fold Change dei geni analizzati nei plutei esposti alle creme solari rispetto al controllo. In particolare, il trattamento S4 ha determinato l'aumento dei livelli di espressione di alcuni geni di stress coinvolti in diversi pathways, tra cui *hsp70*, *tbk1* e *tlr4* rispettivamente di 4.43, 1.47 e 0.92 volte rispetto al controllo. Il trattamento S5 ha determinato la diminuzione dei livelli di espressione di *14-3-3 E* (-2.16) e l'aumento di *hsp70* (4.96) e *tbk1* (0.61) rispetto al controllo. Nel trattamento S6 si registra una down-regolazione per *hsp70* (-2.88) e una up-regolazione per *tlr4* (2.82). Nel trattamento S8 si registra la diminuzione dell'espressione genica rispetto al controllo per quanto riguarda *hsp70* (-1.67 volte) e *p38MAPK* (-1.67 volte), mentre in *tbk1* e *tlr4* si verifica l'aumento rispettivamente di 0.73 e 0.91 volte rispetto al controllo. Il trattamento S9 evidenzia tra i geni considerati l'up-regolazione rispetto al controllo in *tlr4* (5.2). Infine, il trattamento S11 determina principalmente la down-regolazione dei geni, tra cui *CAT* (-1.5), *gpx* (-1.74), *MDR1* (-2.08) e *p38 MAPK* (-2.61).



**Fig. 4.17:** Heatmap che mostra i profili di espressione dei 15 geni analizzati tramite Real Time PCR espressi nelle larve di *P. lividus* al T<sub>48</sub> utilizzando il metodo del  $2\Delta\Delta Cq$  (Livak & Schmittgen, 2008 ). I valori sono stati trasformati utilizzando la scala logaritmica in base 2. I geni up-regolati e down-regolati rispetto al controllo sono indicati rispettivamente in verde e in rosso.

## 5. Discussione

Lungo le coste del Mar Mediterraneo, il turismo rappresenta uno dei principali settori in crescita, registrando un PIL pari a 14.900 miliardi di euro nel 2016, rappresentando il secondo afflusso economico più grande al mondo (Tovar-Sánchez et al., 2019). I maggiori impatti provocati da questo fenomeno derivano dall'utilizzo delle creme solari che inevitabilmente vengono rilasciate in mare, costituendo una seria minaccia per tutti gli organismi marini, tra cui i ricci che vivono nelle zone costiere (Sartori et al., 2017). Tra questi, *Paracentrotus lividus* rappresenta una specie chiave nell'ecosistema costiero ed è sensibile a diverse tipologie di inquinanti ambientali (Zito et al., 2005; Kobayashi & Okamura, 2005; Bellas, 2008; Bosnjak et al., 2010; Pinsino et al., 2010; Bonaventura et al., 2011; Pagano et al., 2017; Ruocco et al., 2020), come ad esempio pesticidi (Aluigi et al., 2008), metalli pesanti (Pinsino et al., 2010; Russo et al., 2003), radiazioni ionizzanti (Bonaventura et al., 2005, 2011; Lister et al., 2010 a,b), riscaldamento ed acidificazione degli oceani (Byrne et al., 2012), tossine naturali e inquinanti emergenti (Ruocco et al., 2017; Russo et al., 2014), che possono compromettere il normale sviluppo embrionale e larvale (Kobayashi, 1991; Warnau & Pagano, 1994; Pagano et al., 2017; Ragusa et al., 2017).

Questo lavoro di tesi ha avuto come scopo principale la ricerca degli effetti provocati dalle creme solari sullo sviluppo embrionale e larvale del *Paracentrotus lividus*, a causa del notevole incremento del loro utilizzo e rilascio negli ecosistemi marini di tutto il mondo (Sureda et al., 2018). In particolare, sono state studiate creme solari contenenti filtri UV organici tra cui MBBT, DHHB, BEMT, ET, ES, ampiamente presenti in protezioni solari già disponibili in commercio. L'effetto di questi filtri è tuttavia, ad oggi, poco noto sugli organismi marini (Miller et al., 2021). Pertanto, è stato studiato l'effetto delle creme solari su *P. lividus* sia dal punto di vista morfologico che molecolare.

I risultati delle analisi morfologiche hanno mostrato che i prodotti testati sono in grado di agire come degli inquinanti essendo capaci di alterare lo sviluppo embrionale e larvale del riccio. I tipi di anomalie osservate negli embrioni e nelle larve di *P. lividus* sono risultati simili in tutti i trattamenti con le diverse creme solari e coerenti con quelli riportati a seguito dell'esposizione a nanoparticelle inorganiche utilizzate come filtri solari (Gambardella et al.,

2013; Manzo et al., 2013; Mesarič et al., 2015; Gambardella et al., 2021). Inoltre, in accordo con i risultati ottenuti da Corinaldesi et al. (2017), gli effetti di filtri UV organici e conservanti contenuti nelle creme solari sono risultati più evidenti sullo sviluppo larvale essendo probabilmente più vulnerabile a tali sostanze. Ad esempio, i formulati S1 e S2 che contengono alcuni filtri UV organici, tra cui etilesil salicilato (ES) hanno provocato un impatto elevato dopo 24 ore dalla fecondazione. È stato recentemente dimostrato che l'ES può avere effetti negativi sull'attività metabolica e sulla crescita algale di *Tetraselmis* sp. (Thorel et al., 2020) mentre determina impatti minori su *Artemia salina* (Thorel et al., 2020) e su alcune specie di corallo (Danovaro et al., 2008). Inoltre S1 e S2, contengono anche fragranze, denominate “parfum” che, grazie alla loro scarsa biodegradabilità, si accumulano nell'ambiente acquatico e possono agire come distruttori endocrini (Bom et al., 2019; Maipas & Nicolopoulou-Stamati, 2015). Anche i formulati S9, S10 e S11 hanno determinato impatti moderati/elevati sullo sviluppo embrionale e larvale di *P. lividus*. Questo può dipendere dalla presenza degli stessi filtri presenti in S1 e S2, fragranze, surfattanti tra cui idrossido di sodio e decil glucoside, i cui effetti sono stati osservati sulle uova del riccio di mare, in quanto inibiscono l'elevazione della membrana di fecondazione, e si propagano fino agli stadi successivi di sviluppo (Amouroux et al., 1999). Inoltre, il glicole propilenico, presente in S9, S10 e S11, potrebbe provocare un effetto tossico su embrioni e larve di riccio perché deriva dalla lavorazione del petrolio, anche se questo composto determina minimi impatti su alcune specie di corallo tra cui *Acropora* spp., *Stylophora pistillata*, *Millepora complanata* (Bom et al., 2019; Danovaro et al., 2008). Dai risultati ottenuti nel presente studio si evince che le fragranze, presenti nei formulati solari, potrebbero non essere le responsabili del 100% delle anomalie poiché probabilmente risultano mascherate da altre sostanze più tossiche. Infatti, nonostante S11 ne sia priva induce comunque effetti morfologici simili a S9 e S10 su embrioni e larve.

Altri prodotti risultati dannosi per le larve di *P. lividus* sono stati S12 e S13. Queste sostanze, a differenza delle altre, sono caratterizzate dalla presenza di acido fenilbenzimidazolo solfonico (PBSA) che può provocare stress ossidativo, danni al DNA, infiammazione e apoptosi sugli adulti di *Mytilus edulis* esposti per 14 giorni ad una concentrazione di 10 µg/L (Falfushynska et al., 2021). Inoltre sono presenti emollienti tra cui dibutil adipato ed etilesil

glicerina con effetti potenzialmente tossici per l'uomo causando allergie (Khalid & Abdollahi, 2021), emulsionanti come trietanolamina che può determinare effetti cronici a lungo termine sull'alga *Phaeodactylum tricornerum* e molluschi *Crassostrea gigas* e *Mytilus galloprovincialis* (Libralato et al., 2010). Un altro tipo di formulato testato è lo Stick, il quale, se comparato con il Controllo mano, non mostra una notevole alterazione nei vari tempi di sviluppo ad eccezione del T<sub>72</sub>, dove si osserva un impatto elevato. In questo caso sono presenti i medesimi filtri organici contenuti nelle altre creme analizzate ed altri ingredienti ancora poco studiati in ambiente marino e pertanto, necessitano di ulteriori studi al fine di comprendere i potenziali responsabili delle malformazioni.

Tra le creme solari che hanno determinato un ISI lieve sia sullo sviluppo embrionale che larvale vi sono S3, S5 e S6. Questi risultati sono in linea con quanto riportato in studi precedenti dove è stato visto che l'esposizione ai filtri UV eco-compatibili come MBBT e BEMT non ha provocato effetti su *Tetraselmis* e *Artemia salina* (Thorel et al., 2020; Maipas & Nicolopoulou-Stamati, 2015). Inoltre, prodotti solari contenenti DHHB ed ET sono stati già testati da Corinaldesi et al. (2017) su *P. lividus* determinando percentuali simili di anomalie in embrioni e larve che risultavano comprese tra il 31.6% e il 65% (Corinaldesi et al., 2017). Inoltre, la presenza di antiossidanti come idrossiacetofenone, potrebbe avere effetti positivi sul normale sviluppo per la funzione di sequestro delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) in ambiente acquoso (Kyrila et al., 2021). Anche i composti S4, S7 e S8 hanno indotto impatti lievi o moderati sullo sviluppo embrionale di *P. lividus*. Queste presentano la medesima composizione presente nei formulati precedenti (S3, S5 e S6), ad eccezione degli emulsionanti idrossietilcellulosa e disodio cetearil solfosuccinato su cui non vi sono, ad oggi, dati disponibili in letteratura. Per il formulato S4 la presenza di ingredienti con effetti lievi o assenti rende più evidenti gli effetti provocati dalle fragranze, il che porta ad un impatto moderato in T<sub>48</sub>.

Un interessante e innovativo aspetto di questa tesi è rappresentato dalle analisi molecolari effettuate per testare gli effetti delle creme sulle larve di riccio di mare che fino ad ora non erano mai state condotte. Gli effetti molecolari di questi composti sono stati studiati nel dettaglio per comprendere come le creme che determinano diversi livelli di impatto ambientale influenzino i geni coinvolti nella risposta allo stress. Nello specifico, è stato

valutato se le creme solari modulassero l'espressione di 15 geni di stress nello stadio di sviluppo larvale (48 ore dopo la fecondazione), poiché, come già detto in precedenza è risultato più vulnerabile agli impatti provocati dalle creme solari, considerando quei trattamenti in cui si sono riscontrate le diverse categorie di impatto (lieve, moderato ed elevato): S4, S5, S6, S8, S9 e S11.

I risultati ottenuti hanno mostrato che le creme solari sono capaci di modulare l'espressione di geni implicati in una vasta gamma di vie metaboliche che la cellula utilizza per bilanciare lo stress (Migliaccio et al., 2014). Tra i geni di stress analizzati vi sono quelli che codificano per le heat shock proteins, tra cui *hsp70*, *hsp60* e *hsp56*, che esercitano un ruolo protettivo come chaperoni, assistendo il corretto ripiegamento delle proteine e prevenendo la loro aggregazione in risposta a vari fattori di stress in *P. lividus* inclusi i metalli (Clayton et al., 2000; Gupta et al., 2010) come rame (Morrone et al., 2019) manganese e cadmio (Di Natale et al., 2019), radiazione UV-B (Bonaventura et al., 2006) e nanoparticelle di polistirene (Pinsino et al., 2017). Tra questi, *hsp70* è risultato up-regolato in S4 e S5, *hsp60* in S5 e *hsp56* in S4 rispetto al controllo. L'aumento dell'espressione di *hsp70*, come è stato osservato, è coinvolta nella resistenza all'apoptosi, aumentando la probabilità di sopravvivenza (Bonaventura et al., 2006) per mezzo dell'attivazione di meccanismi di sopravvivenza e recupero (Galasso et al., 2020) ed è considerato un biomarcatore universale di stress (Johnstone et al., 2019; Roccheri et al., 2004). Tuttavia, la down-regolazione di questo gene osservata con tutte le altre creme analizzate può essere dovuto un sovraccarico del sistema di difesa dalle ROS, non più in grado di rispondere adeguatamente e la conseguente attivazione di altri geni coinvolti nella morte cellulare (Galasso et al., 2020). I risultati ottenuti potrebbero essere legati al livello di anomalie osservate, utilizzato poi per calcolare l'indice ISI: fino alle malformazioni appartenenti al livello 2 (ritardo dello sviluppo e braccia piegate) potrebbe essere favorita un maggiore espressione di questi geni, come osservato in S4 e S5, mentre quando le anomalie ricadono nel livello 3 (embrioni bloccati in diversi tempi di sviluppo) diventano irreversibili con conseguente down-regolazione del gene (come osservato in S6, S8, S9 e S11) e contemporanea attivazione di altri geni che determinano la morte cellulare (Galasso et al., 2020).

Un altro importante gene considerato è *14-3-3 epsilon* che codifica per proteine coinvolte in molti importanti eventi cellulari, compresa la risposta allo stress, la sopravvivenza e l'apoptosi. La sua espressione è risultata modulata a seguito dell'esposizione con S4, S5, S6, S8 e S11 (down-regolato) e di S9 (up-regolato), in accordo con altri studi che hanno testato altri agenti stressanti su *P. lividus* tra cui: nanoparticelle di carbonio (Carata et al., 2012), radiazioni UV-B (Bonaventura & Matranga, 2017; Russo et al., 2010) e ai metaboliti secondari dalle diatomee (Albarano et al., 2019), suggerendo quindi il suo coinvolgimento nella risposta allo stress ambientale del riccio di mare (Chiaramonte et al., 2020). Al contrario, la down-regolazione di *14-3-3 E* potrebbe essere dovuta alla sua alterazione nell'espressione sito-specifica, come provocato dalla radiazione UV-B; normalmente questo gene è localizzato ed espresso nell'intestino, mentre invece, a seguito dell'esposizione lo è ovunque nell'embrione, provocando di conseguenza difetti morfologici (Russo et al., 2010).

Altri geni analizzati sono *tlr4*, *p38 MAPK*, *tbk1* e *NF-kB* noti essere interconnessi nella regolazione della risposta immunitaria. La presenza di fattori di stress è riconosciuta da recettori di membrana rappresentati dai Toll-like Receptor, nello specifico da *tlr4* in *P. lividus* (Pinsino et al., 2015). Per questo gene, si è osservata l'up-regolazione con S4, S6, S8 e S9, così come accade dopo l'esposizione alle NP di TiO<sub>2</sub> nelle cellule immunitarie (Pinsino et al., 2015) e con lo stimolo lipopolisaccaridico (LPS), che simula l'infezione batterica (Chiaramonte et al., 2021). Inoltre, si è verificata la down-regolazione con l'esposizione a S5 e a S11 come è stato visto mediante l'incubazione con gingerolo su cellule immunitarie di *P. lividus* trattate con LPS, esibendo un effetto antinfiammatorio, probabilmente al fine di prevenire una infezione attivando il gene che codifica per la proteina p38 MAPK (Chiaramonte et al., 2021). L'up-regolazione del gene *p38 MAPK*, come osservato nel trattamento S4, può anche compromettere la scheletogenesi di *P. lividus* nelle prime fasi di sviluppo (Varrella et al., 2016; Bonaventura et al., 2021; Pinsino et al., 2014). Al contrario, l'esposizione alle creme solari S5, S6, S8, S9 e S11 così come accade con l'esposizione alle NP di TiO<sub>2</sub> ha mostrato una significativa inibizione nei livelli fosforilati di protein chinasi attivate da mitogeno p38 (Dong et al., 2002). Infatti, nelle cellule immunitarie del riccio di mare *p38 MAPK* mantiene l'omeostasi, prevenendo la proliferazione di potenziali cellule cancerogene (Pinsino et al., 2015). La risposta infiammatoria viene attuata tramite altre chinasi come *tbk1*, che a sua volta fosforila fattori di trascrizione come *NF-kB* (Chiaramonte

et al., 2021). Per *tbk1* è presente l'up-regolazione in S4, S5 e S8 dimostrando la presenza di un fattore che altera il sistema immunitario, mentre si è vista la down-regolazione in S6 e S11 che, probabilmente, previene una risposta infiammatoria eccessiva (Pinsino et al., 2015). *NF- $\kappa$ B* è risultato down-regolato in presenza delle creme S5, S9 e S11 ma anche con l'attacco virale (Chiaromonte et al., 2019) e potrebbe avere un effetto antinfiammatorio, conferendo una maggiore tolleranza alle cellule immunitarie (Pinsino et al., 2015). Inoltre, svolge un ruolo nell'infezione, nell'apoptosi e nel determinare le risposte cellulari a stimoli extracellulari (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Un'altra chinasi attivata da *p38 MAPK* è *pi3k*, coinvolta nella protezione dallo stress (Clarke et al., 2021) e nella mediazione dei segnali necessari per la scheletogenesi nell'embrione del riccio di mare. Questo gene è risultato down-regolato in tutti i trattamenti considerati e questo potrebbe spiegare i difetti della struttura scheletrica osservati sulla morfologia delle larve (Bradham et al., 2004).

Sono state inoltre analizzate le variazioni di espressione di quattro geni che forniscono un efficace meccanismo di detossificazione contro l'aumento dei livelli di ROS promuovendo la loro conversione in prodotti meno reattivi e tossici per la cellula (Regoli et al., 1995). La diminuzione dei livelli di espressione di *CAT* in tutti i trattamenti considerati (ad eccezione di S8) ha suggerito che probabilmente diversi sistemi di detossificazione potrebbero essere attivati dalle creme solari nel riccio di mare, così come è stato osservato da Varrella et al. (2014) a seguito dell'esposizione alle aldeidi polinsature PUAs. Per quanto riguarda *gpx*, esso è risultato down-regolato in tutti i trattamenti considerati, mentre *MnSOD* unicamente in S5. L'esposizione combinata, in accordo con i risultati sopracitati, a sulfametossazolo (SMX, antimicrobico) e Cd ha esercitato un effetto negativo sul livello di espressione di questi geni in *P. lividus* determinando una significativa down-regolazione (Ragusa et al., 2017). Inoltre, per *MnSOD*, è stata osservata una up-regolazione in S4, poiché l'enzima codificato è coinvolto nella prima linea di difesa contro le ROS (Louis et al., 2017). *MDR1* è un gene importante la cui attività è indotta da dosi letali di specifici contaminanti (come ad esempio l'oxibenzone e il cloruro di mercurio) durante lo sviluppo embrionale del riccio di mare (Bošniak et al., 2013). Questo gene risulta essere down-regolato in tutti i trattamenti considerati, così come osservato dopo l'esposizione cronica al rame (Groba et al., 2017). Quindi, se questi geni coinvolti nella detossificazione sono down-regolati, non avverrà lo

smaltimento delle ROS, inducendo un danno ossidativo che può compromettere la sopravvivenza degli organismi (Sureda et al., 2018).

Il gene che codifica per la chinasi JNK (*jnk*) svolge un ruolo nella differenziazione delle cellule T, nella via dell'apoptosi cellulare (Mehan et al., 2011) e nei meccanismi che operano in risposta allo stress (Pinsino et al., 2015) dal momento che viene attivato in presenza di fattori stressanti come radiazione UV, decadienale (Ruocco et al., 2017) e NP di TiO<sub>2</sub> (Pinsino et al., 2015). La diminuzione, in accordo con quanto osservato in questo lavoro a livello di S4, S5, S6 e S9, si è osservata con l'esposizione di *P. lividus* alla miscela di idrossiacidi prodotta dalle diatomee (Albarano et al., 2019), portando all'aberrazione degli embrioni perché ha funzioni nello sviluppo (Long et al., 2015; Glaviano et al., 2021) e potrebbe essere responsabile di quegli embrioni che appaiono morfologicamente bloccati negli stadi precedenti a quello larvale.

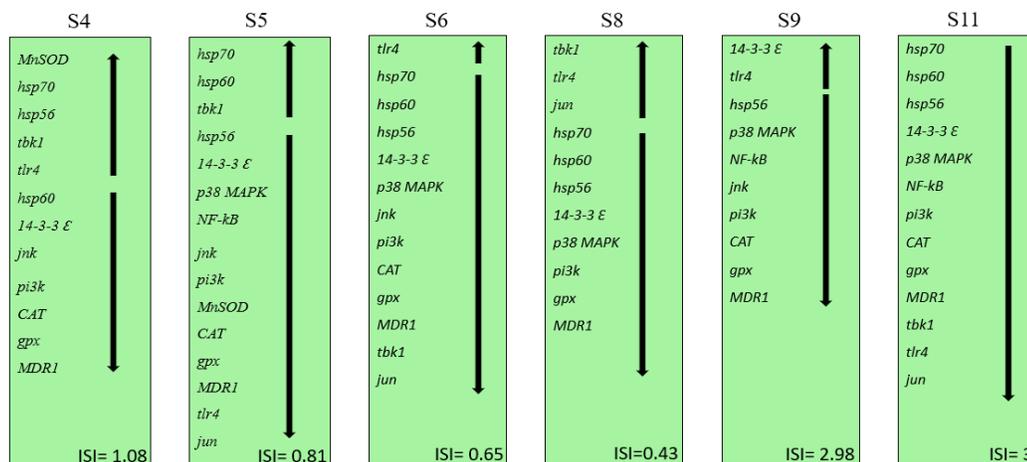
Infine, è stata analizzata l'espressione di *jun*, componente della rete di regolazione genica che controlla la scheletogenesi, la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi (Russo et al., 2014). Un aumento dell'espressione genica nelle larve esposte al formulato S8, sembra dovuta proprio al suo importante ruolo nella difesa cellulare in risposta allo stress ossidativo (Bonaventura et al., 2015); ma si è anche osservata la sua down-regolazione con i trattamenti S5, S6 e S11, come è accaduto con l'esposizione alle NP di TiO<sub>2</sub>, portando ad eventuali difetti scheletrici (Alijagic et al., 2020).

Esistono una serie di geni, tra cui quelli analizzati in questa tesi, in grado di offrire protezione dai danni causati dallo stress ed appartengono ad un sistema di difesa, soprannominato "defensoma", come riportato per il riccio di mare *Strongylocentrotus purpuratus* (Goldstone et al., 2006). Questo sistema consente di mettere in atto una difesa contro sostanze chimiche tossiche (Marrone et al., 2012) che includono composti naturali e inquinanti di origine antropica, (Goldstone et al., 2006), garantendo una maggiore sopravvivenza (Ruocco et al., 2017). Per cui si potrebbe ipotizzare che anche le creme solari siano in grado di attivare questa azione di difesa.

In generale, l'alterazione dell'espressione genica può indurre malformazioni negli embrioni e nelle larve di riccio di mare (Morrone et al., 2019). Infatti, l'analisi morfologica ha mostrato chiaramente che la maggior parte delle malformazioni, trovate in seguito al trattamento con

le creme solari, colpisce lo scheletro delle larve di *P. lividus* poiché le creme solari hanno come bersaglio diversi geni implicati in quei determinati processi.

Questo lavoro ha messo in luce un importante aspetto relativo agli effetti negativi delle creme solari sull'embriogenesi del riccio. In particolare, i formulati che hanno determinato i valori di ISI più bassi, possono modulare l'espressione di numerosi geni di stress analizzati (Figura 5.1).



**Fig. 5.1:** Rappresentazione grafica dei geni di stress risultati target esponendo i plutei di *P. lividus* ai composti solari studiati (S4, S5, S6, S8, S9, S11).

Nello specifico, S5 è la crema solare che ha il maggior numero di bersagli molecolari, in quanto ha determinato la variazione dell'espressione di 15 geni coinvolti nella risposta allo stress, seguita da S6 (con 13 geni come bersagli) e da S8 (con 11 geni bersagli). Dal momento che la sola differenza in termini di composizione tra S6 e S5 è la presenza di fragranze in quest'ultima, si può suggerire che i responsabili della modulazione di un maggior numero di geni siano le fragranze, che si accumulano nell'ambiente acquatico (Bom et al., 2019) e nonostante i bassi livelli raggiunti, nell'ordine di grandezza del  $\mu\text{g/L}$  o inferiore, i dati indicano che gli adulti di riccio di mare sono in grado di accumularli (Rocha et al., 2018). Dai risultati ottenuti nel presente studio si può suggerire che l'impatto delle creme solari sullo sviluppo embrionale cambia a seconda della tipologia di filtro organico e componenti presenti all'interno dei formulati. Inoltre, l'analisi dei geni di stress, identificati come potenziali biomarcatori, rappresenta un ulteriore utile strumento per valutare gli impatti provocati dalle creme solari sullo stato di salute delle larve di riccio (Albarano et al., 2021).

## 6. Conclusioni

I risultati della presente tesi forniscono nuove evidenze relative agli effetti tossici provocati dalle creme solari, contenenti filtri UV organici, nell'ambiente marino, rivelando l'elevata sensibilità dello sviluppo di *P. lividus* a tali inquinanti emergenti. Dal punto di vista morfologico, si è osservato che le creme solari basate su filtri UV organici causano diversi gradi di impatto, alterando sia lo sviluppo embrionale che larvale. Tuttavia non è possibile identificare esattamente i responsabili di tale impatto in quanto l'effetto potrebbe essere dovuto a più ingredienti e/o alla loro azione sinergica.

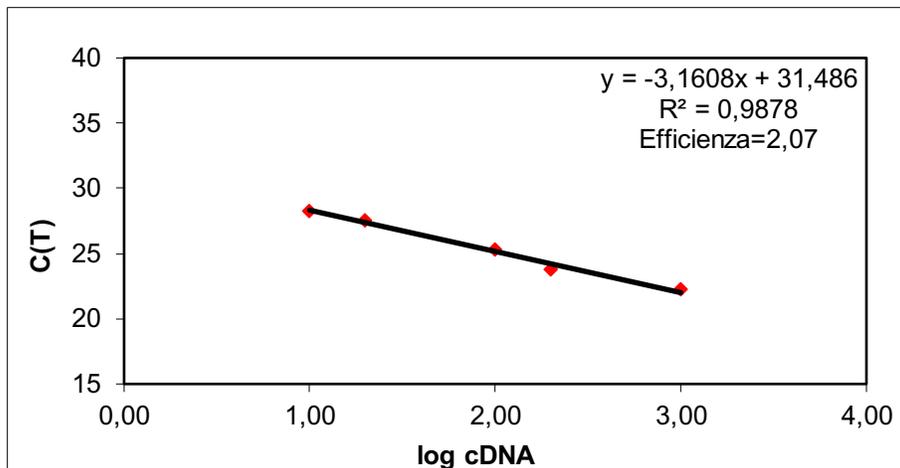
Malgrado i prodotti contenenti filtri UV organici studiati in questa tesi (MBBT, DHHB, BEMT, DBT, ET, ES e PBSA) possono essere considerati una valida alternativa a quelli contenenti filtri inorganici, si è osservato che tra questi, i prodotti contenuti ES e PBSA, possono provocare effetti tossici sul riccio di mare. Dai risultati ottenuti si evidenzia che è necessario lo sviluppo di nuovi prodotti ecocompatibili, dati dalla sostituzione di ingredienti in grado di determinare impatti sugli organismi modello, che devono essere testati, prima della loro immissione sul mercato, su una vasta gamma di specie marine, al fine di limitare le conseguenze negative sugli ecosistemi marini e allo stesso tempo proteggere la salute umana.

Inoltre la presente ricerca ha mostrato che le creme testate sono in grado di agire come degli inquinanti tradizionali, in quanto possono alterare lo sviluppo embrionale e larvale di un organismo modello per gli studi ecotossicologici (*P. lividus*) ed attivare differenti classi di geni. Tali geni, considerati biomarcatori universali di stress ambientale, potrebbero essere integrati con l'indice di impatto delle creme solari (ISI) per valutare il diverso effetto delle creme solari sugli organismi marini. Lo studio dell'espressione genica si è rivelato pertanto uno strumento sensibile per identificare gli effetti delle creme solari anche laddove l'indagine morfologica non ne permetteva la rilevazione.

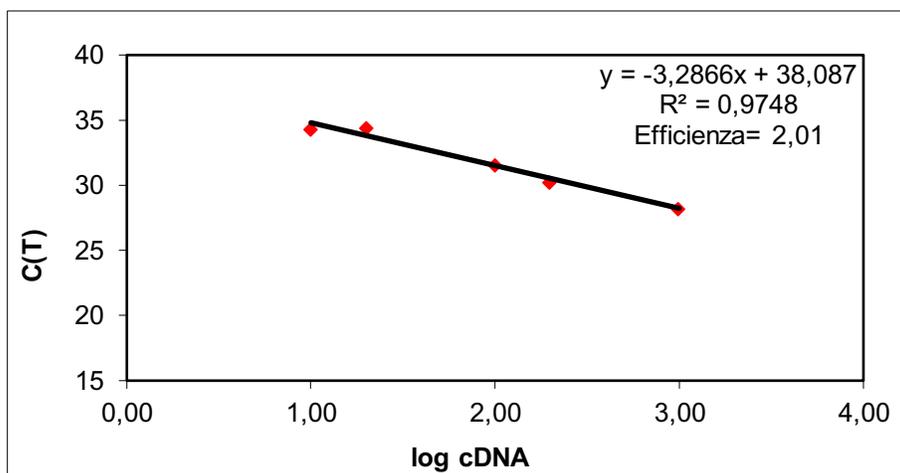
## **APPENDICE**

**Appendice I:** Rette di efficienza dei geni analizzati.

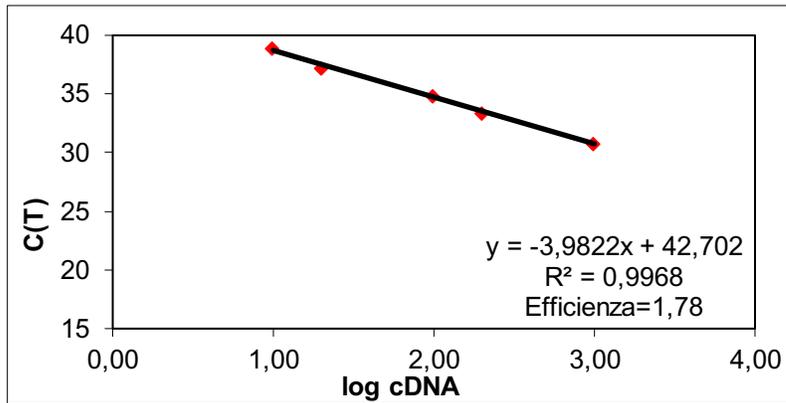
**PI-Ubiquitina**



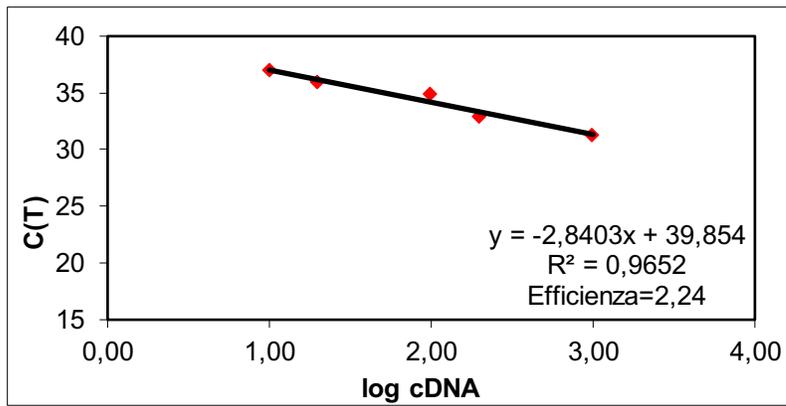
**PI-Z-12-1**



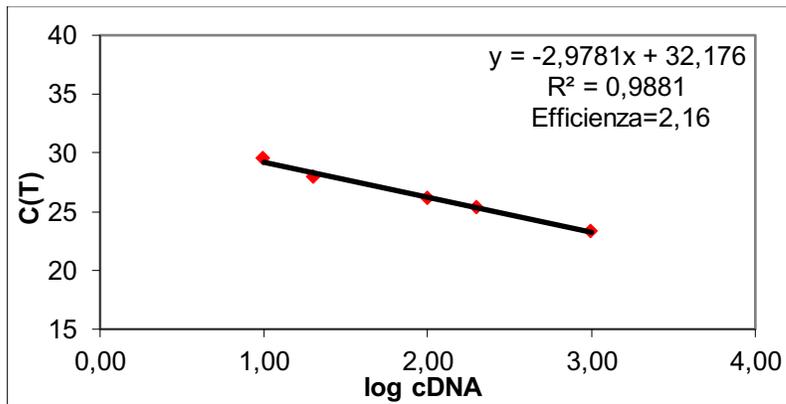
***PI-CAT***



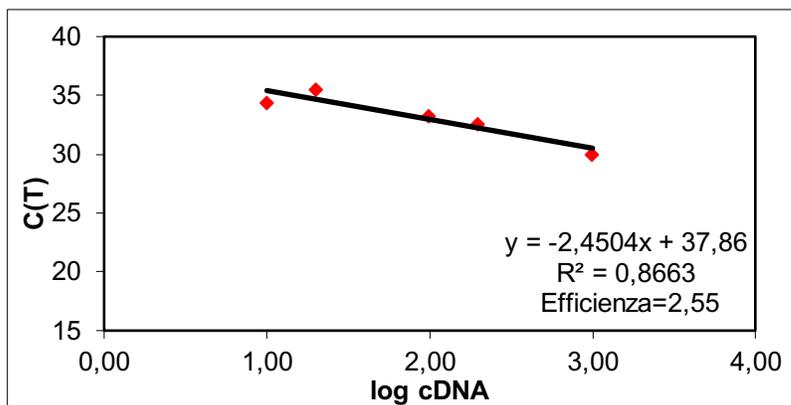
***PI-MnSOD***



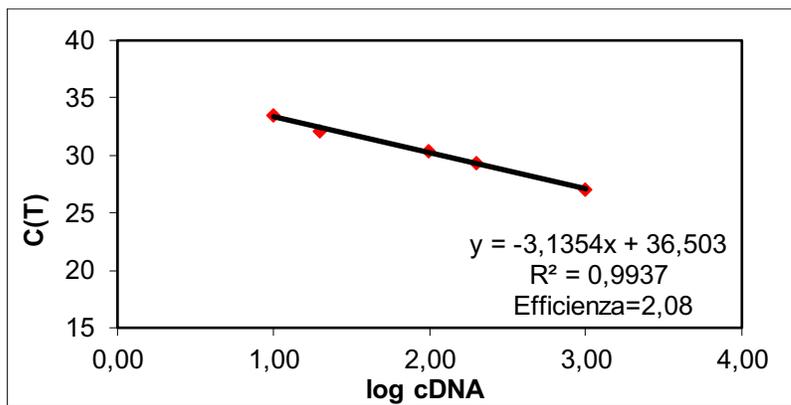
***PI-gpx***



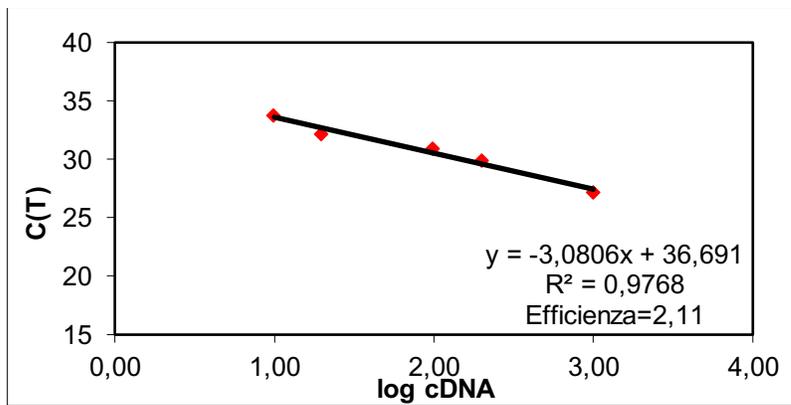
***Pl-hsp70***



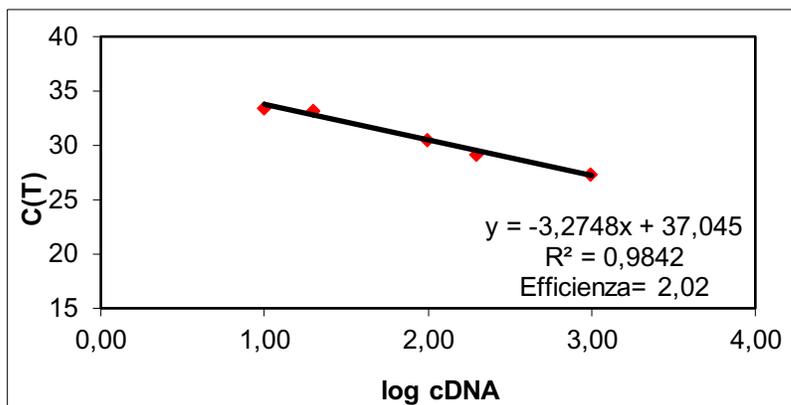
***Pl-hsp60***



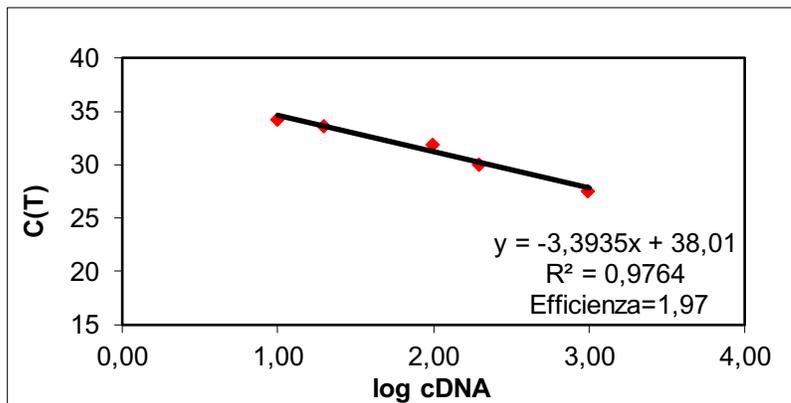
***Pl-hsp56***



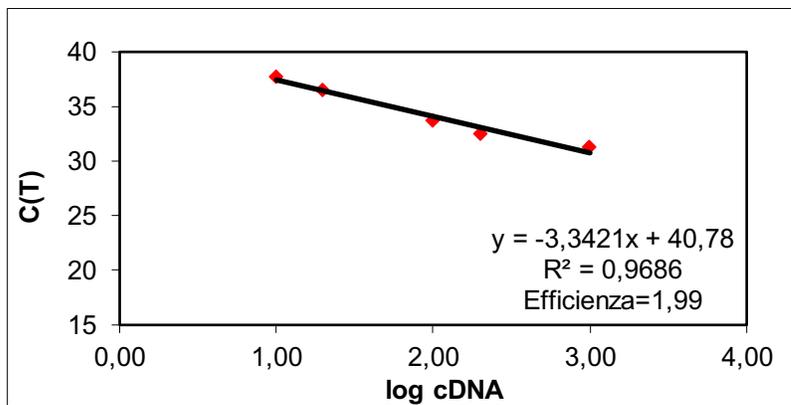
***Pl-pi3k***



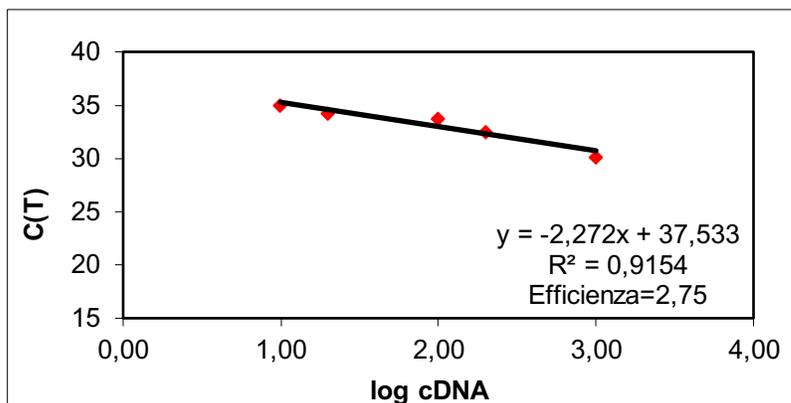
***Pl-jun***



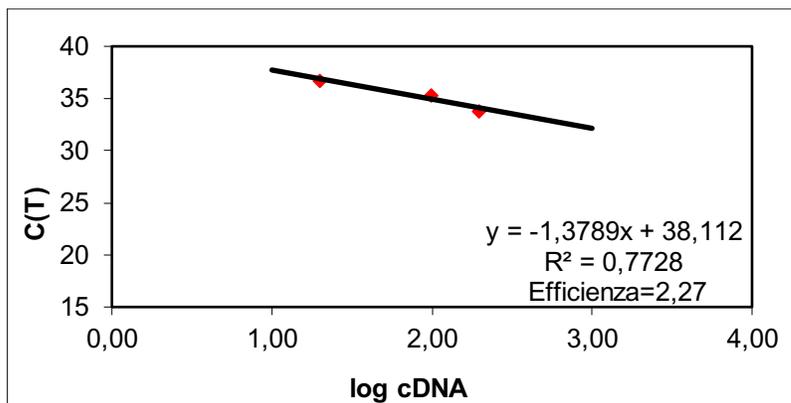
***Pl-jnk***



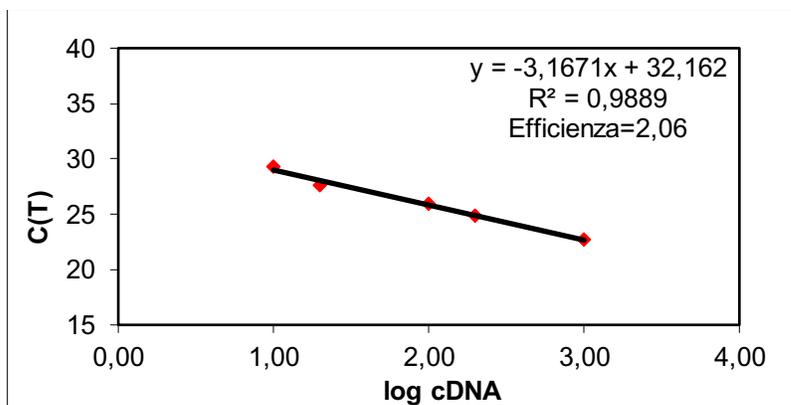
***PI-NF- $\kappa$ B***



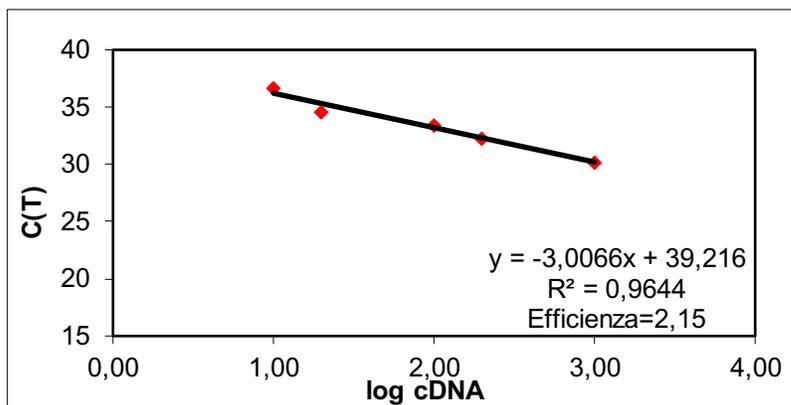
***PI-p38 MAPK***



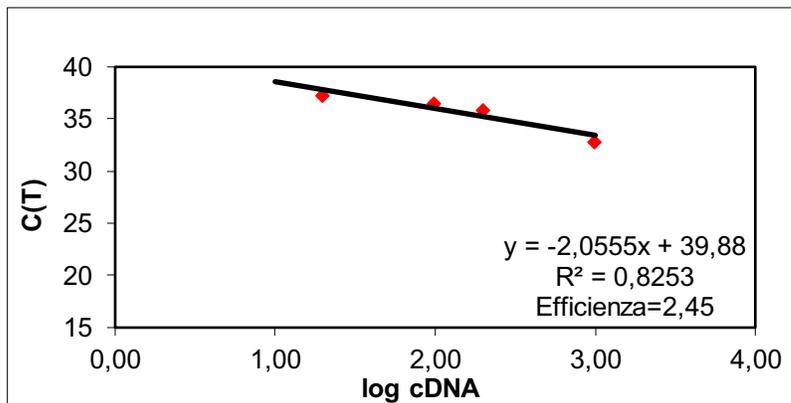
***PI-14-3-3  $\epsilon$***



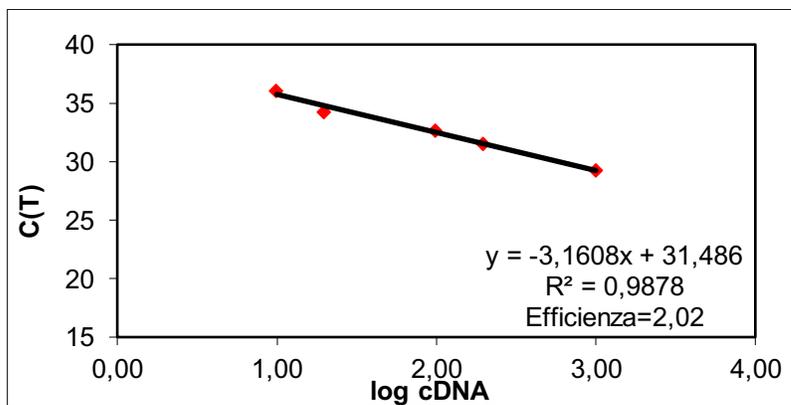
***PI-tbk1***



***PI-tlr4***



***PI-MDR1***



**Appendice II:** Valori di espressione genica ( $\Delta Cq$ ) della Figura 4.16.

	<b>Contr</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S8</b>	<b>S9</b>	<b>S11</b>
<i>hsp70</i>	0,117123	2,14558	53,06283	0,21799	0,169153	0,317957	0,456023
<i>hsp60</i>	0,280243	0,653227	3,71355	1,85273	1,19184	0,99061	1,27373
<i>hsp56</i>	0,160555	0,906783	1,90521	2,03176	0,863945	0,85168	1,034945
<i>CAT</i>	0,254633	1,14127	1,09807	2,075285	1,68158	0,569057	0,763507
<i>gpx</i>	0,521925	1,146985	1,799045	3,17752	1,22545	0,54604	0,928057
<i>MnSOD</i>	0,255815	0,981215	0,84653	3,178612	0,80391	0,656977	1,400147
<i>jnk</i>	0,257775	0,46508	0,41042	1,884175	1,47431	0,33808	1,901885
<i>jun</i>	0,229413	0,509875	0,88792	1,574465	1,245513	0,831767	0,71611
<i>NF-kB</i>	0,221367	1,433595	1,05656	2,338015	1,44405	0,588327	0,999857
<i>pi3k</i>	0,271077	1,23987	0,764537	1,781755	1,366015	0,28989	1,490153
<i>14-3-3 E</i>	0,320845	0,52947	0,600963	1,537775	1,072633	1,89864	2,4985
<i>p38 MAPK</i>	0,326523	1,046647	1,463227	1,554885	0,507837	0,763413	0,52793
<i>tbk1</i>	0,09312	1,14186	2,647725	1,808265	1,091857	0,594387	0,654227
<i>MDR1</i>	0,168935	1,107403	1,985095	1,82191	1,046797	0,69247	0,748357
<i>tlr4</i>	0,14767	0,65679	0,378895	1,00871	0,887917	0,508565	0,486477

**Appendice III:** Valori di Fold Change della Figura 4.17 trasformati in forma logaritmica in base 2.

	<b>Contr</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S8</b>	<b>S9</b>	<b>S11</b>
<i>CAT</i>	0,22921	-0,9776	-0,9371	-0,6941	0,00157	-1,1737	-1,4981
<i>MnSOD</i>	0,09619	0,26938	-0,5133	0,0614	0,0223	0,08251	-0,0542
<i>gpx</i>	0,10528	-0,9911	-0,9127	-0,7076	-0,4626	-1,1507	-1,7399
<i>jun</i>	0,16475	0,04696	-0,4428	-0,6878	0,27801	0,00218	-1,3559
<i>jnk</i>	0,2563	-0,4476	-0,3673	-0,3653	0,18879	-0,1187	-0,1854
<i>pi3k</i>	0,10942	-0,6077	-0,9393	-0,7397	-0,2374	-0,6642	-0,5409
<i>NF-kB</i>	0,04902	-0,063	-0,2735	0,0186	0,0543	-0,5696	-0,8369
<i>14-3-3 E</i>	0,0431	-1,3659	-2,166	-1,4586	-0,8594	0,37813	-0,7149
<i>hsp60</i>	0,1264	-0,7839	0,40019	-0,8193	-0,4555	0,10727	-0,7455
<i>hsp70</i>	0,1752	4,43067	4,9602	-2,8858	-1,6697	-0,0852	-1,1365
<i>p38 MAPK</i>	0,32331	0,26651	-0,6607	-0,5972	-1,6752	-0,158	-2,6134
<i>hsp56</i>	0,10165	0,22957	-0,6237	-1,0076	-0,5593	-0,2148	-1,3508
<i>tbk1</i>	0,12078	1,46952	0,61378	-0,4713	0,72841	0,15265	-1,1296
<i>MDR1</i>	0,29731	0,12029	-0,8575	-1,4746	-0,4664	-0,9978	-2,0769
<i>tlr4</i>	0,28748	0,91658	-0,259	2,81941	0,90985	5,20215	-0,9211

## Bibliografia

1. Adams, J.A., 1983. Effect of PCB (aroclor 1254) on early development and mortality in Arbacia eggs. *Water Air Soil Pollut.* 20, 1–5.
2. Adler, B.L.; DeLeo, V.A. Sunscreen safety: A Review of recent studies on humans and the environment. *Curr. Dermatol. Rep.* 2020, 9, 1–9.
3. Ahmed, F. K., Lim, H. W., & Draeos, Z. D. (2009). Worldwide regulation of UV filters: current status and future trends. *Clinical guide to sunscreens and photoprotection*, 65-81.
4. Albarano, L., Zupo, V., Guida, M., Libralato, G., Caramiello, D., Ruocco, N., & Costantini, M. (2021). PAHs and PCBs Affect Functionally Intercorrelated Genes in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* Embryos. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12498.
5. Albarano, L., Ruocco, N., Ianora, A., Libralato, G., Manfra, L., & Costantini, M. (2019). Molecular and morphological toxicity of diatom-derived hydroxyacid mixtures to sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. *Marine drugs*, 17(3), 144.
6. Alijagic, A., Gaglio, D., Napodano, E., Russo, R., Costa, C., Benada, O., Kofronova, O., Pinsino, A., 2020. Titanium dioxide nanoparticles temporarily influence the sea urchin immunological state suppressing inflammatory-related gene transcription and boosting antioxidant metabolic activity. *J. Hazard Mater.* 384, 121389.
7. Allen, J.M., Gossett, C.J., Allen, S.K., 1996. Photochemical formation of singlet molecular oxygen in illuminated aqueous solutions of several commercially available sunscreen active ingredients. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 605–609.
8. Aluigi, M.G., Angelini, C., Corte, G., Falugi, C., 2008. The sea urchin, *Paracentrotus lividus*, embryo as a “bioethical” model for neurodevelopmental toxicity testing: effects of diazinon on the intracellular distribution of OTX2-like proteins. *Cell Biology and Toxicology* 24, 587e601.
9. Amemiya, S. (1996) ‘Complete regulation of development throughout metamorphosis of sea urchin embryos devoid of macromeres’, *Development, Growth and Differentiation*, 38(5), pp. 465–476.
10. Amouroux, I., Pesando, D., Noel, H., & Girard, J. P. (1999). Mechanisms of cytotoxicity by cosmetic ingredients in sea urchin eggs. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 36(1), 28-37.
11. Anselmo, H.M.R., Koerting, L., Devito, S., Van den Berg, J.H.J., Dubbeldam, M., Kwadijk, C., Murk, A.J., 2011. Early life developmental effects of marine persistent organic pollutants on the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 2182–2192.
12. Babicki, S.; Arndt, D.; Marcu, A.; Liang, Y.; Grant, J.R.; Maciejewski, A.; Wishart, D.S. Heatmapper: Web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, W147–W153.
13. B. Bacetti, C. Bedini et al., *Lineamenti di zoologia sistematica*, Zanichelli, 1994
14. Barone, A. N., Hayes, C. E., Kerr, J. J., Lee, R. C., & Flaherty, D. B. (2019). Acute toxicity testing of TiO<sub>2</sub>-based vs. oxybenzone-based sunscreens on clownfish (*Amphiprion ocellaris*). *Environmental Science*

- and Pollution Research*, 26(14), 14513-14520.
15. Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussates* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals, implication for the implementation of sea water criteria. *Aquaculture* 230, 205–213.
  16. Bellas, J., 2008. Prediction and assessment of mixture toxicity of compounds in antifouling paints using the sea-urchin embryo-larval bioassay. *Aquat. Toxicol.* 88, 308–315.
  17. Bickers, D.R., Calow, P., Greim, H.A., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J.-H., Sipes, I.G., Smith, R.L., Tagami, H., 2003. The safety assessment of fragrance materials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 218e273.
  18. Bilal, M., Mehmood, S., & Iqbal, H. (2020). The beast of beauty: environmental and health concerns of toxic components in cosmetics. *Cosmetics*, 7(1), 13.
  19. A. Bodini, C. Bondavalli, S. Allesina, *L'ecosistema e le sue relazioni*, FrancoAngeli, 2007
  20. Bom, S., Jorge, J., Ribeiro, H. M., & Marto, J. (2019). A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *Journal of Cleaner Production*, 225, 270-290.
  21. Bonaventura, R., et al., 2011. Echinoderms: model organisms for marine environmental monitoring and development of new emerging technologies. In: *Marine Research at CNR Volume DTA/06-(2011)*. Department of Earth and Environment. National Research Council of Italy, pp. 1967–1978.
  22. Bonaventura, R., Poma, V., Costa, C., Matranga, V., 2005. UV-B radiation prevents skeleton growth and stimulates the expression of stress markers in sea urchin embryos. *Biochemical Biophysical Research Communications* 328, 150e157.
  23. Bonaventura, R., Zito, F., Costa, C., Giarrusso, S., Celi, F., Matranga, V., 2011. Stress response gene activation protects sea urchin embryos exposed to X-rays. *Cell Stress Chaperones* 16, 681e687.
  24. Bonaventura, R., Poma, V., Russo, R., Zito, F., & Matranga, V. (2006). Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. *Marine Biology*, 149(1), 79-86.
  25. Bonaventura, R., Zito, F., Russo, R., & Costa, C. (2021). A preliminary gene expression analysis on *Paracentrotus lividus* embryos exposed to UVB, Cadmium and their combination. *Aquatic Toxicology*, 232, 105770.
  26. Bonaventura, R., Russo, R., Zito, F., Matranga, V., 2015. Combined effects of cadmium and UVB radiation on sea urchin embryos: skeleton impairment parallels p38 MAPK
  27. Bonaventura, R., & Matranga, V. (2017). Overview of the molecular defense systems used by sea urchin embryos to cope with UV radiation. *Marine environmental research*, 128, 25-35.
  28. Bonnet A., 1925. Documents pour servir à l'étude des variations chez les Echinides. *Bull Inst Oceanogr (Monaco)* 462: 1-28.
  29. Bosnjak, I., et al., 2010. Sea urchin embryotoxicity test for environmental contaminants-potential role of the MRP proteins. *Water Air Soil Pollut.* 217, 627–636.
  30. Bouillon, C. (2000). Recent advances in sun protection. *Journal of dermatological science*, 23, S57-S61.
  31. Boudouresque C.F., Verlaque M., Azzolina J.F., Meinesz A., Nédélec H., Rico V., 1989. Evolutions des populations de *Paracentrotus lividus* et d'*Arbacia lixula* (Echinoidea) le long d'un transect permanent à

- Galeria (Corse). *Trav Sci Parc Nat Rég Rés Nat Corse* 22: 65-82.
32. Bresch, H., Spielhoff, R., Mohr, U., Barkemeyer, H., 1972. Use of the sea urchin egg for quick screen testing of the biological activities of substances. I. Influence of fractions of a tobacco smoke condensate on early development. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141, 747–752.
  33. Burnett, M. E. & Wang, S. Q. Current sunscreen controversies: A critical review. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 27, 58–67 (2011).
  34. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments.
  35. Byrne M., 1990. Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Mar Biol* 104: 275-289.
  36. Byrne, M., 2012. Global change ecotoxicology: Identification of early life history bottlenecks in marine invertebrates, variable species responses and variable experimental approaches. *Marine Environmental Research* 76, 3e15.
  37. 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.
  38. Caloni, S., Durazzano, T., Franci, G., & Marsili, L. (2021). Sunscreens' UV Filters Risk for Coastal Marine Environment Biodiversity: A Review. *Diversity*, 13(8), 374.
  39. Carata, E., Tenuzzo, B. A., Arnò, F., Buccolieri, A., Serra, A., Manno, D., & Dini, L. (2012). Stress response induced by carbon nanoparticles in *Paracentrotus lividus*. *International journal of molecular and cellular medicine*, 1(1), 30.
  40. Carballeira, C. *et al.* (2012) 'Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine pisciculture effluents', *Marine Environmental Research*, 77, pp. 12–22.
  41. Carvalhais, A., Pereira, B., Sabato, M., Seixas, R., Dolbeth, M., Marques, A., ... & Mieiro, C. (2021). Mild Effects of Sunscreen Agents on a Marine Flatfish: Oxidative Stress, Energetic Profiles, Neurotoxicity and Behaviour in Response to Titanium Dioxide Nanoparticles and Oxybenzone. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1567.
  42. 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.
  43. Castro, M., Fernandes, J.O., Pena, A., Cunha, S.C., 2018. Occurrence, profile and spatial distribution of UV-filters and musk fragrances in mussels from Portuguese coastline. *Mar. Environ. Res.* 138, 110–118.
  44. Catalano, R., Labille, J., Gaglio, D., Alijagic, A., Napodano, E., Slomberg, D., ... & Pinsino, A. (2020). Safety evaluation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle-based sunscreen UV filters on the development and the immunological state of the sea urchin *Paracentrotus Lividus*. *Nanomaterials*, 10(11), 2102.

45. Ceccherelli, G., Pinna, S., & Sechi, N. (2009). Evaluating the effects of protection on *Paracentrotus lividus* distribution in two contrasting habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81(1), 59-64.
46. T.E.A.Chalew, R.U. Halden, *Journal of the American Water Resources Association* 45 (2009) 4-13.
47. Chiaramonte, M., Bonaventura, R., Costa, C., Zito, F., & Russo, R. (2021). [6]-Gingerol dose-dependent toxicity, its role against lipopolysaccharide insult in sea urchin (*Paracentrotus lividus* Lamarck), and antimicrobial activity. *Food Bioscience*, 39, 100833.
48. Chiaramonte, M., Russo, R., Costa, C., Bonaventura, R., & Zito, F. (2020). PI3K inhibition highlights new molecular interactions involved in the skeletogenesis of *Paracentrotus lividus* embryos. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(1), 118558.
49. Clarke, T. L., Johnson, R. L., Simone, J. J., & Carlone, R. L. (2021). The Endocannabinoid System and Invertebrate Neurodevelopment and Regeneration. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 2103.
50. Clayton, M.E., Steinmann, R., Fent, K., 2000. Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquat. Toxicol.* 47 (3e4), 213e226.
51. T. Consortium, Iuclid Data Set. Vol. 44. New York, TCC Consortium (2002).
52. 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.
53. 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), 1-12.
54. 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.
55. Danovaro, R., & Corinaldesi, C. (2003). Sunscreen products increase virus production through prophage induction in marine bacterioplankton. *Microbial ecology*, 45(2), 109-118.
56. Danovaro, R., Bongiorni, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., ... & Pusceddu, A. (2008). Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental health perspectives*, 116(4), 441-447.
57. C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 907.
58. Di Natale, M., Bennici, C., Biondo, G., Masullo, T., Monastero, C., Tagliavia, M., ... & Nicosia, A. (2019). Aberrant gene expression profiles in Mediterranean sea urchin reproductive tissues after metal exposures. *Chemosphere*, 216, 48-58.
59. G.S. Dhillon, S. Kaur, R. Pulicharla, S.K. Brar, M. Cledón, M. Verma, Y.S. Rao, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12 (2015) 5657-5684.
60. M.S. Díaz-Cruz, M. Llorca, D. Barceló, Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and

- disinfection by-products in the aquatic environment, *TrAC Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 873–887.
61. Dong, C., Davis, R. J. & Flavell, R. A. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 55–72 (2002)
  62. Downs CA, Kramarsky-Winter E, Fauth JE et al (2014) Toxicological effect of the sunscreen UV filter, benzophenone-2, on planulae and in vitro cells of the coral, *Stylophora pistillata*. *Ecotoxicology* 23:175–191.
  63. Downs, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., ... & Loya, Y. (2016). Toxicopathological effects of the sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the US Virgin Islands. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 70(2), 265-288.
  64. S. E. Duirk, D. R. Bridenstine, D. C. Leslie. Reaction of benzophenone UV filters in the presence of aqueous chlorine: Kinetics and chloro-form formation. *Water Res.* 2013, 47, 579–587
  65. EC (European Community). Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH). Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council. *Off J Eur Commun* 2006(L396):1–849.
  66. EEC (European Economic Community). Council Directive 76/768/EEC. Council Directive of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products. *Off J Eur Commun* 1976(L262):1–169.
  67. Elghamery, A.A., Elnahas, A.I., Mansour, M.M., 2000. The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in rootmeristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia* 55, 209–215
  68. European Commission. 2005. Commission Directive 2005/9/EC of 28 January 2005 amending Council Directive 76/768/EEC, concerning cosmetic products, for the purposes of adapting Annex VII thereto to technical progress
  69. 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(7), 1-13.
  70. Falfushynska, H., Sokolov, E. P., Fisch, K., Gazie, H., Schulz-Bull, D. E., & Sokolova, I. M. (2021). Biomarker-based assessment of sublethal toxicity of organic UV filters (ensulizole and octocrylene) in a sentinel marine bivalve *Mytilus edulis*. *Science of The Total Environment*, 798, 149171.
  71. 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.
  72. Fel J-P, Lacherez C, Bensetra A et al (2019) Photochemical response of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* to some sunscreen ingredients. *Coral Reefs* 38:109–122.
  73. Fel J-P et al (2018) Photochemical response of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* to some sunscreen ingredients. *Coral Reefs* 38(1):109–122
  74. Fent, K., Zenker, A., Rapp, M., 2010. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic

- ecosystems in Switzerland. *Environ. Pollut.* 158, 1817–1824.
75. Fernandez C. and Pergent G., 1998. Effect of different formulated diets and rearing condition on growth parameters in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J Shellfish Res* 17:1571-1581.
  76. Fernández, N., Beiras, R., 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early growth of the *Paracentrotus lividus* sea urchin. *Ecotoxicology* 10, 263–271
  77. Forestier, S. (2008). Rationale for sunscreen development. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(5), S133-S138.
  78. Gago-Ferrero, P., Alonso, M.B., et al., 2013. First determination of UV filters in marine mammals. Octocrylene levels in Franciscana Dolphins. *Environ. Sci. Technol.* 47 (11),5619–5625.
  79. 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*, 117608.
  80. Gambardella, C. *et al.* (2013) ‘Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles.’, *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 130–131, pp. 77–85.
  81. 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.
  82. Glaviano, F., Ruocco, N., Somma, E., De Rosa, G., Campani, V., Ametrano, P., ... & Zupo, V. (2021). Two Benthic Diatoms, *Nanofrustulum shiloi* and *Striatella unipunctata*, Encapsulated in Alginate Beads, Influence the Reproductive Efficiency of *Paracentrotus lividus* by Modulating the Gene Expression. *Marine drugs*, 19(4), 230.
  83. Goldstone JV, Hamdounb A, Coleb BJ, Howard-Ashbyc M, Nebertd DW, Scallye M, Dean M, Epel D, Hahn ME, Stegeman JJ (2006) The chemical defensome: Environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. 300, 366–384.
  84. Grabicova, K., Fedorova, G., Burkina, V., Steinbach, C., Schmidt-Posthaus, H., Zlabek, V., Kocour Kroupova, H., Grabic, R., Randak, T., 2013. Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 96, 41e47.
  85. Grbović, G., Trebše, P., Dolenc, D., Lebedev, A. T., & Sarakha, M. (2013). LC/MS study of the UV filter hexyl 2-[4-(diethylamino)-2-hydroxybenzoyl]-benzoate (DHHB) aquatic chlorination with sodium hypochlorite. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(11), 1232-1240.
  86. 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.
  87. Groba, S.R., Guttman, S., Niemietz, C., Bernick, F., Sauer, V., Hachmüller, O., Karst, U., Zischka, H., Zibert, A., Schmidt, H.H., 2017. Downregulation of hepatic multi-drug resistance protein 1 (MDR1) after

- copper exposure. *Metallomics* 9, 1279e1287
88. Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci.* 86, 377e384.
  89. Hayward P.J., Ryland J.S., 1990. *The Marine Fauna of British Isles and North-West Europe*, 2. Clarendon Press, Oxford, UK.
  90. Hanson, K.M., Gratton, E., Bardeen, C.J., 2006. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 1205–1212.
  91. 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.
  92. Heilgeist, S., Sekine, R., Sahin, O., & Stewart, R. A. (2021). Finding Nano: Challenges Involved in Monitoring the Presence and Fate of Engineered Titanium Dioxide Nanoparticles in Aquatic Environments. *Water*, 13(5), 734
  93. H. Holbech, U. Norum, B. Korsgaard, P. Bjerregaard, *Pharmacol. Toxicol.* 91 (2002) 204.
  94. Hose, J.E., Puffer, H.W., Oshida, P.S., Bay, S.M., 1983. Developmental and cytogenetic abnormalities induced in the purple sea urchin by environmental levels of benzo(a) pyrene. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 319–325.
  95. House of Representatives Twenty-Ninth Legislature (2017) HB600 HD1Sunscreen; personal care products; oxybenzone; ban. State of Hawaii.
  96. Huang, Y., Law, J. C. F., Lam, T. K., & Leung, K. S. Y. (2021). Risks of organic UV filters: A review of environmental and human health concern studies. *Science of The Total Environment*, 755, 142486.
  97. Johnstone J, Nash S, Hernandez E, Rahman MS. 2019. Effects of elevated temperature on 461 gonadal functions, cellular apoptosis, and oxidative stress in Atlantic sea urchin *Arbacia 462 punctulata*. *Marine Environmental Research* 149:40-49
  98. Khalid, M., & Abdollahi, M. (2021). Environmental Distribution of Personal Care Products and Their Effects on Human Health. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 20(1), 216-253.
  99. Kobayashi, N., Okamura, H., 2005. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. Part 2. Interactive toxic effects of heavy metals in synthetic mine effluents. *Chemosphere* 61, 1198–1203.
  100. Kobayashi, N., 1991. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Tanabe Bay, Wakayama Prefecture, Japan, 1970e1987. *Mar. Pollut. Bull. Environ. Manag. Approp. Use Enclosed Coast. Seas* 23, 709e713
  101. J. Kockler, M. Oelgemöller, S. Robertson, B. D. Glass. Photostability of sunscreens. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 2012, 13, 91–110.
  102. Krause, M. et al. Sunscreens: Are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *Int. J. Androl.* 35, 424–436 (2012).
  103. Kyrila, G., Katsoulas, A., Schoretsaniti, V., Rigopoulos, A., Rizou, E., Doulgeridou, S., ... & Touraki, M. (2021). Bisphenol A removal and degradation pathways in microorganisms with probiotic

- properties. *Journal of Hazardous Materials*, 413, 125363.
104. Inbaraj, J.J., Bilski, P., Chignell, C.F., 2002. Photophysical and photochemical studies of 2-phenylbenzimidazole and UVB sunscreen 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid. *Photochem. Photobiol.* 75, 107–116.
  105. H. Ishibashi, N. Matsumura, M. Hirano, M. Matsuoka, H. Shiratsuchi, Y. Ishibashi, Y. Takao, K. Arizono, *Aquatic Toxicology* 67(2) (2004) 167-179.
  106. Labille, J., Slomberg, D., Catalano, R., Robert, S., Apers-Tremelo, M. L., Boudenne, J. L., ... & Radakovitch, O. (2020). Assessing UV filter inputs into beach waters during recreational activity: A field study of three French Mediterranean beaches from consumer survey to water analysis. *Science of the Total Environment*, 706, 136010.
  107. Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 253–278.
  108. A.J. Li, Z. Sang, C.H. Chow, J.C.F. Law, Y. Guo, K.S.Y. Leung, Environmental behavior of 12 UV filters and photocatalytic profile of ethyl-4-aminobenzoate, *J. Hazard. Mater.* (2017),
  109. Libralato, G., Ghirardini, A. V., & Avezzù, F. (2010). Seawater ecotoxicity of monoethanolamine, diethanolamine and triethanolamine. *Journal of hazardous materials*, 176(1-3), 535-539.
  110. Lister, K.N., Lamare, M.D., Burritt, D.J., 2010a. Sea ice protects the embryos of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* from oxidative damage due to naturally enhanced levels of UV-B radiation. *Journal of Experimental Biology* 213, 1967e1975.
  111. Lister, K.N., Lamare, M.D., Burritt, D.J., 2010b. Oxidative damage in response to natural levels of UV-B radiation in larvae of the tropical sea urchin *Tripneustes gratilla*. *Photochemistry and Photobiology* 86, 1091e1098.
  112. Long, J.T.; Irwin, L.; Enomoto, A.C.; Grow, Z.; Ranck, J.; Peeler, M.T. Jun N-terminal kinase activity is required for invagination but not differentiation of the sea urchin archenteron. *Genesis* 2015, 53, 762–769.
  113. Louis, Y. D., Bhagooli, R., Kenkel, C. D., Baker, A. C. & Dyal, S. D. Gene expression biomarkers of heat stress in scleractinian corals: promises and limitations. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharm.* 191, 63–77 (2017).
  114. Lozano J., Galera J., Lopez S., Turon X., Palacin C., Morera G., 1995. Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar Ecol Prog Ser* 122: 179-19.
  115. Ma, H.; Kabengi, N.; Bertsch, P.; Unrine, J.; Glenn, T.; Williams, P. Comparative phototoxicity of nanoparticulate and bulk ZnO to a free-living nematode *Caenorhabditis elegans*: The importance of illumination mode and primary particle size. *Environ. Pollut.* 2011, 159, 1473–1480.
  116. Maipas, S., & Nicolopoulou-Stamati, P. (2015). Sun lotion chemicals as endocrine disruptors. *Hormones*, 14(1),46.
  117. Manzo, S. *et al.* (2013) ‘Embryotoxicity and spermiotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*’, *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 254–255(1), pp. 1–9

118. Marrone, V., Piscopo, M., Romano, G., Ianora, A., Palumbo, A., & Costantini, M. (2012). Defense against toxic diatom aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *PLoS One*, 7(2), e31750.
119. Matranga, V., & Corsi, I. (2012). Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches. *Marine environmental research*, 76, 32-40.
120. McCoshum SM, Schlarb AM, Baum KA (2016) Direct and indirect effect of sunscreen exposure for reef biota. *Hydrobiologia* 776:139–146.
121. Mehan, S., Meena, H., Sharma, D., Sankhla, R., 2011. JNK: a stress-activated protein kinase therapeutic strategies and involvement in Alzheimer's and various neurodegenerative abnormalities. *J. Mol. Neurosci*
122. Mesarič, T. *et al.* (2015) 'Sperm exposure to carbon-based nanomaterials causes abnormalities in early development of purple sea urchin (*Paracentrotus lividus*)', *Aquatic Toxicology*.
123. Migliaccio, O., Castellano, I., Romano, G., & Palumbo, A. (2014). Stress response to cadmium and manganese in *Paracentrotus lividus* developing embryos is mediated by nitric oxide. *Aquatic Toxicology*, 156, 125-134.
124. 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.
125. Molins-Delgado, D., Máñez, M., Andreu, A., Hiraldo, F., Eljarrat, E., Barceló, D., Díaz-Cruz, M.S., 2017. A potential new threat to wild life: presence of UV filters in bird eggs from a preserved area. *Environ. Sci. Technol.* 51, 10983–10990.
126. Molins-Delgado, D., Muñoz, R., Nogueira, S., Alonso, M.B., Torres, J.P., Malm, O., Ziolli, R.L., Hauser-Davis, R.A., Eljarrat, E., Barceló, D., Díaz-Cruz, M.S., 2018. Occurrence of organic UV filters and metabolites in lebranche mullet (*Mugil liza*) from Brazil. *Sci. Total Environ.* 618, 451–459.
127. A. Mojetta, A. Ghisotti, Flora e fauna del Mediterraneo, Mondadori, 2003
128. Morroni, L., Sartori, D., Costantini, M., Genovesi, L., Magliocco, T., Ruocco, N., & Buttino, I. (2019). First molecular evidence of the toxicogenetic effects of copper on sea urchin *Paracentrotus lividus* embryo development. *Water research*, 160, 415-423.
129. M. Nakajima, T. Kawakami, T. Niino, Y. Takahashi, S. Onodera. Aquatic fate of sunscreen agents octyl-4-methoxycinnamate and octyl-4-dimethylaminobenzoate in model swimming pools and their mutagenic assays of their chlorination byproducts. *J. Health Sci.* 2009, 55(3), 363–372.
130. N. Negreira, P. Canosa, I. Rodríguez, M. Ramil, E. Rubí, R. Cela. Study of some UV filters stability in chlorinated water and identification of halogenated by-products by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2008, 1178, 206–214.
131. Oliviero, M., Schiavo, S., Rametta, G., Miglietta, M. L., & Manzo, S. (2017). Different sizes of ZnO diversely affected the cytogenesis of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Science of the Total Environment*, 607, 176-183.
132. Oliviero, M., Schiavo, S., Dumontet, S., & Manzo, S. (2019). DNA damages and offspring quality in sea urchin *Paracentrotus lividus* sperms exposed to ZnO nanoparticles. *Science of The Total Environment*, 651,

756-765.

133. D.R. Orvos, D.J. Versteeg, J. Inauen, M. Capdevielle, A. Rothenstein, V. Cunningham, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(7) (2002) 1338-1349.
134. Osterwalder, U., Sohn, M., Herzog, B., 2014. Global state of sunscreens. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 30, 62e80.
135. Ouréns R., Fernández L., Freire J., 2011. Geographic, population, and seasonal patterns in the reproductive parameters of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar. Biol.* 158: 793-804.
136. Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E., Giordano, G.G., Trieff, N. M., 1985. Comparative toxicities of chlorinated biphenyls on sea urchin egg fertilisation and embryogenesis. *Mar. Environ. Res.* 17, 240–244.
137. Pagano, G., et al., 2017. Sea urchin bioassays in toxicity testing: I. Inorganics, organics, complex mixtures and natural products. *Expert Opin. Environ. Biol.* 6, 1.
138. 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.
139. Peng, X., Fan, Y., Jin, J., Xiong, S., Liu, J., Tang, C., 2017. Bioaccumulation and biomagnification of ultraviolet absorbents in marine wildlife of the Pearl River Estuarine, South China Sea. *Environ. Pollut.* 225, 55–65.
140. Pérez, S., Beiras, R., 2010. The mysid *Siriella armata* as a model organism in marine ecotoxicology: comparative acute toxicity sensitivity with *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 19 (1), 196–206
141. Pestana, E., Belak, S., Diallo, A., Crowther, J. R., & Viljoen, G. J. (2010). *Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics-real time PCR applications*. Springer Science & Business Media.
142. Pillai, M.C., Vines, C.A., Wikramanayake, A.H., Cherr, G.N., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons disrupt axial development in sea urchin embryos through a  $\beta$ -catenin dependent pathway. *Toxicology* 186, 93–108.
143. Pillard, D. A., & DuFresne, D. L. (1999). Toxicity of formulated glycol deicers and ethylene and propylene glycol to *Lactuca sativa*, *Lolium perenne*, *Selenastrum capricornutum*, and *Lemna minor*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 37(1), 29-35.
144. Pinsino, A., et al., 2010. Sea urchin embryos as an in vivo model for the assessment of manganese toxicity: developmental and stress response effects. *Ecotoxicology* 19, 555–562
145. Pinsino, A., Russo, R., Bonaventura, R., Brunelli, A., Marcomini, A., & Matranga, V. (2015). Titanium dioxide nanoparticles stimulate sea urchin immune cell phagocytic activity involving TLR/p38 MAPK-mediated signalling pathway. *Scientific reports*, 5(1), 1-12.
146. Pinsino, A., Bergami, E., Della Torre, C., Vannuccini, M. L., Addis, P., Secci, M., ... & Corsi, I. (2017). Amino-modified polystyrene nanoparticles affect signalling pathways of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) embryos. *Nanotoxicology*, 11(2), 201-209.

147. Pinsino, A., Roccheri, M. C., & Matranga, V. (2014). Manganese overload affects p38 MAPK phosphorylation and metalloproteinase activity during sea urchin embryonic development. *Marine environmental research*, *93*, 64-69.
148. Poiger T, Buser HR, Balmer ME, et al. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere*
149. Prato, E., Fabbrocini, A., Libralato, G., Migliore, L., Parlapiano, I., D'Adamo, R., ... & Biandolino, F. (2021). Comparative toxicity of ionic and nanoparticulate zinc in the species *Cymodoce truncata*, *Gammarus aequicauda* and *Paracentrotus lividus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
150. 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.
151. Ragusa, M. A., Costa, S., Cuttitta, A., Gianguzza, F., & Nicosia, A. (2017). Coexposure to sulfamethoxazole and cadmium impairs development and attenuates transcriptional response in sea urchin embryo. *Chemosphere*, *180*, 275-284.
152. Regoli, F., & Principato, G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic toxicology*, *31*(2), 143-164.
153. Roccheri M, Agnello M, Bonaventura R, Matranga V. 2004. Cadmium induces the expression of 526 specific stress proteins in sea urchin embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *321*:80–87
154. Rocha, A. C., Camacho, C., Eljarrat, E., Peris, A., Aminot, Y., Readman, J. W., ... & Almeida, C. M. (2018). Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental research*, *161*, 354-363.
155. 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.
156. Rodríguez, A. S., Sanz, M. R., & Rodríguez, J. B. (2015). Occurrence of eight UV filters in beaches of Gran Canaria (Canary Islands). An approach to environmental risk assessment. *Chemosphere*, *131*, 85-90.
157. Rosenfeld, P.E., Feng, L.G.H., 2011 Emerging contaminants. In: *Risk of Hazardous wastes*, pp. 215–222.
158. Ruocco, N., Costantini, S., Zupo, V., Romano, G., Ianora, A., Fontana, A., & Costantini, M. (2017). High-quality RNA extraction from the sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. *PLoS One*, *12*(2), e0172171.
159. Ruocco, N., Bertocci, I., Munari, M., Musco, L., Caramiello, D., Danovaro, R., ... & Costantini, M. (2020). Morphological and molecular responses of the sea urchin *Paracentrotus lividus* to highly contaminated marine sediments: The case study of Bagnoli-Coroglio brownfield (Mediterranean Sea). *Marine environmental research*, *154*, 104865.
160. Ruocco, N., Fedele, A. M., Costantini, S., Romano, G., Ianora, A., & Costantini, M. (2017). New inter-correlated genes targeted by diatom-derived polyunsaturated aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *142*, 355-362.

161. Russo, R., Bonaventura, R., & Matranga, V. (2014). Time- and dose-dependent gene expression in sea urchin embryos exposed to UVB. *Marine environmental research*, 93, 85-92.
162. Russo, R., Bonaventura, R., Zito, F., Schröder, H.C., Müller, I., Müller, W.E., Matranga, V., 2003. Stress to cadmium monitored by metallothionein gene induction in *Paracentrotus lividus* embryos. *Cell Stress & Chaperones* 8, 232e241.
163. Russo, R., Zito, F., Costa, C., Bonaventura, R., & Matranga, V. (2010). Transcriptional increase and misexpression of 14-3-3 epsilon in sea urchin embryos exposed to UV-B. *Cell Stress and Chaperones*, 15(6), 993-1001.
164. Ruskiewicz, J. A., Pinkas, A., Ferrer, B., Peres, T. V., Tsatsakis, A., & Aschner, M. (2017). Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. *Toxicology reports*, 4, 245-259.
165. San Martín G.A., 1995. Contribution à la gestion des stocks d'oursins: étude des populations et transplantations de *Paracentrotus lividus* à Marseille (France, Méditerranée) et production de *Loxechinus albus* à Chiloe (Chili, Pacifique). Ph. D. Thesis, Université d'Aix – Marseille, 166 pp.
166. Sakamoto, K., Lochhead, R.Y., Maibach, H.I., Yamashita, Y., 2017. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. John Fedor, Amsterdam.
167. V. A. Sakkas, D. L. Giokas, D. A. Lambropoulou, T. A. Albanis. Aqueous photolysis of the sunscreen agent octyl-dimethyl-p-aminobenzoic acid. Formation of disinfection byproducts in chlorinated swimming pool water. *J. Chromatogr. A* 2003, 1016, 211–222.
168. Sanchez-Espana A.I., Martinez-Pita I., Garcia F.J., 2004. Gonadal growth and reproduction in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) from southern Spain. *Hydrobiologia* 519: 61–72.
169. 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.
170. Sánchez-Quiles, D., & Tovar-Sánchez, A. (2015). Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? *Environment international*, 83, 158-170.
171. 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, pp 60.
172. Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
173. Schlumpf, M. et al. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters—an update. *Toxicology* 205, 113-22 (2004).
174. M. Schlumpf, B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann, W. Lichtensteiger, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 239.
175. Serpone, N., Salinaro, A., Emeline, A.V., Horikoshi, S., Hidaka, H., Zhao, J., 2002. An in vitro systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 970–981.
176. Sharifan H (2020) Alarming the impacts of the organic and inorganic UV blockers on endangered coral's

- species in the Persian Gulf: a scientific concern for coral protection. *Sustain Futur* 2:100017.
177. Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., Dhawan, A., 2009. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. Lett.* 185, 211–218.
  178. Shpigel M., McBride S.C., Marciano S., Lupatsch I., 2004. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*. 232: 343-355.
  179. 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.
  180. Stien D, Clergeaud F, Rodrigues AMS et al (2019) Metabolomics reveal that octocrylene accumulates in *Pocillopora damicornis* tissues as fatty acid conjugates and triggers coral cell mitochondrial dysfunction. *Anal Chem* 91:990–995.
  181. Stien D, Suzuki M, Rodrigues AMS et al (2020) A unique approach to monitor stress in coral exposed to emerging pollutants. *Sci Rep* 10:1–12.
  182. Suman, T.; Rajasree, S.R.; Kirubakaran, R. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015, 113, 23–30.
  183. 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.
  184. Suzuki, N., Ogiso, S., Yachiguchi, K., Kawabe, K., Makino, F., Toriba, A., Kiyomoto, M., Sekiguchi, T., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kitamura, K., Hong, C.-S., Srivastav, A.K., Oshima, Y., Hattori, awa KA., Hayakawa, K., 2015. Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons influence spicule formation in the early development of sea urchins (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 171, 55–60.
  185. Talapatra, S. N., & Konar, S. (2016). Predictive acute toxicity comparison in *Daphnia magna* for common organic chemicals present in cosmetics by using two QSAR modeling softwares. *World Scientific News*, (42), 101-118.
  186. N. Tatarazako, H. Ishibashi, K. Teshima, K. Kishi, K. Arizono, *Journal of Environmental Physiology and Toxicology* 11(2) (2004) 133-140.
  187. Thorel, E., Clergeaud, F., Jaugeon, L., Rodrigues, A., 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.
  188. Tourism Highlights, 2018 edition, Tourism Market Trends UNWTO; UNWTO; <http://mkt.unwto.org/publication/unwtotourism-highlights> (accessed 7.31.18).
  189. 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.

190. 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.
191. Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., & Blasco, J. (Eds.). (2020). *Sunscreens in Coastal Ecosystems: Occurrence, Behavior, Effect and Risk* (Vol. 94). Springer Nature.
192. Tsui, M. M., Leung, H. W., Kwan, B. K., Ng, K. Y., Yamashita, N., Taniyasu, 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.
193. Tsui, M. M., Leung, H. W., Wai, T. C., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., ... & 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.
194. Turja, R., Höher, N., Snoeijs, P., Baršienė, J., Butrimavičienė, L., Kuznetsova, T., ... & Lehtonen, K. K. (2014). A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*). *Science of the Total Environment*, 473, 398-409.
195. UNEP. Sustainable Coastal Tourism—An Integrated Planning and Management Approach.
196. US Congress (2014) Public Law 113 – 79 113th Congress An Act. Sunscreen Innovation Act. 1–357
197. US Food and Drug Administration (2011) 21 CFR Parts 201 and 310 Labeling and Effectiveness Testing; Sunscreen Drug Products for Over-the- Counter Human Use Federal Register/ Vol. 76, No. 117/Friday, June 17, 2011. 76:35678–35681
198. US Food and Drug Administration (2019) Sunscreen drug products for over-the-counter human use: proposed rule. Fed Regist 84:6204–6275
199. Varrella, S., Romano, G., Costantini, S., Ruocco, N., Ianora, A., Bentley, M.G., 2016. Toxic diatom aldehydes affect defence gene networks in sea urchins. *PLoS One* 11, e0149734.
200. Varrella, S., Romano, G., Ianora, A., Bentley, M. G., Ruocco, N., & Costantini, M. (2014). Molecular response to toxic diatom-derived aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine drugs*, 12(4), 2089-2113.
201. Vidal-Liñán, L., Villaverde-de-Sáa, E., Rodil, R., Quintana, J.B., Beiras, R., 2018. Bioaccumulation of UV filters in *Mytilus galloprovincialis* mussel. *Chemosphere* 190, 267–271.
202. 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*.
203. Warnau, M., Pagano, G., 1994. Developmental toxicity of PbCL<sub>2</sub> in the echinoid *Paracentrotus lividus* (echinodermata). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 434e441.
204. Westphal, J., Kümmerer, K., & Olsson, O. (2020). Experimental and in silico assessment of fate and effects of the UV filter 2-phenylbenzimidazole 5-sulfonic acid and its phototransformation products in aquatic solutions. *Water research*, 171, 115393.
205. Wijgerde T, van Ballegooijen M, Nijland R et al (2020) Adding insult to injury: effects of chronic

- oxybenzone exposure and elevated temperature on two reef-building corals. *Sci Total Environ* 733:139030
206. Wiseman, D.A., Wells, S.M., Hubbard, M., Welker, J.E., Black, S.M., 2007. Alterations in zinc homeostasis underlie endothelial cell death induced by oxidative stress from acute exposure to hydrogen peroxide. *Am. J. Physiol. Lung. C.* 292 (1), L165–L177.
207. Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I., Nel, A.E., 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nano particles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2 (10), 2121–2134.
208. 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.
209. Zhang, J.; Wages, M.; Cox, S.B.; Maul, J.D.; Li, Y.; Barnes, M.; Hope-Weeks, L.; Cobb, G.P. Effect of titanium dioxide nanomaterials and ultraviolet light coexposure on African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 2012, 31, 176–183.
210. Zito, F., et al., 2005. Cell adhesion and communication: a lesson from echinoderm embryos for the exploitation of new therapeutic tools. In: Matranga, V. (Ed.), *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, vol. 39. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 7–44.
211. Zmozinski, A. V., Pretto, T., Borges, A. R., Duarte, A. 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.