



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale

in

Scienze Ambientali

Curriculum Monitoraggio e risanamento dell'ambiente

Tesi di Laurea Magistrale:

**Effetti dei filtri UV Octocrilene e Etilsil salicilato su
alimentazione e riproduzione del copepode *A. tonsa*
(Dana, 1849)**

Relatore:

Prof. Marco Picone

Correlatrice:

Prof.ssa Annamaria Volpi
Ghirardini

Laureanda:

Arianna Tagliapietra
817431

Anno accademico:

2024/2025

INDICE

Abstract	pag. 6
1. INTRODUZIONE	pag. 7
1.1 Inquadramento problema e scopo della tesi	pag. 7
1.2 I filtri UV	pag. 8
1.2.1 Etilsil salicilato	pag. 10
1.2.2 Octocrilene	pag. 11
1.3 La specie test	pag. 12
1.3.1 Elementi morfologici, biologici ed ecologici della specie test	pag. 13
1.3.2 Il copepode <i>A. tonsa</i> come bioindicatore	pag. 15
1.4 Elementi della teoria Dynamic Energy Budget – DEB (Kooijman, 2010)	pag. 16
1.4.1 Ipotesi di applicazione del DEB a <i>A. tonsa</i>	pag. 18
2. MATERIALI E METODI	pag. 19
2.1 Allevamento di <i>Acartia tonsa</i> in laboratorio	pag. 19
2.1.1 Raccolta delle uova	pag. 21
2.2 Test di tossicità	pag. 24
2.2.1 Le soluzioni test	pag. 25
2.2.2 Procedura test	pag. 25
2.3 Analisi statistica	pag. 28

3. RISULTATI	pag. 29
3.1 Analisi chimiche	pag. 29
3.2 Test di tossicità – generalità	pag. 30
3.2.1 Confronto fra controllo e acetone	pag. 30
3.3 Test di tossicità – Etilsil-salicitalo (EHS)	pag. 32
3.3.1 Produzione di uova	pag. 32
3.3.2 Produzione di pellet fecali	pag. 35
3.3.3 Correlazione uova-pellet	pag. 39
3.4 Test di tossicità – Octocrilene (OCT)	pag. 40
3.4.1 Produzione di uova	pag. 40
3.4.2 Produzione di pellet fecali OCT	pag. 42
3.4.3 Correlazione uova-pellet OCT	pag. 45
4. DISCUSSIONE	pag. 46
4.1 Effetti dell’etilesil-salicilato	pag. 46
4.2 Effetti dell’octrilene	pag. 49
4.3 Considerazioni e prospettive future	pag. 53
5. CONCLUSIONE	pag. 55
RINGRAZIAMENTI	pag. 58
BIBLIOGRAFIA	pag. 59

SITOGRAFIA ----- pag. 65

ALLEGATO I ----- pag. 66

ABBREVIAZIONI:

CAS	Chemical Abstracts Service
DEB	Dynamic Energy Budget
DHI	Danish Hydraulic Institute
DTU	Technical University of Denmark
ECHA	European CHemical Agency
EHS	Etilsil salicilato
ISO	International Organization for Standartizaion
OCT	Octocrilene
PBT	Persistente Bioaccumulabile Tossico

ABSTRACT

I filtri solari presenti nei prodotti cosmetici sono composti organici necessari per proteggere l'epidermide dal rischio cancerogeno legato all'esposizione ai raggi UV. Numerosi studi hanno evidenziato l'effetto avverso di tali filtri su varie specie marine, tuttavia per alcune sostanze quali etilesil salicilato (EHS) e octocrilene (OCT) vi sono pochi dati sugli effetti ecotossicologici. *Acartia tonsa* (Dana, 1849), copepode calanoide, è stato esposto a OCT e EHS a partire dalla schiusa delle uova fino al raggiungimento della maturità sessuale, al fine di determinare eventuali effetti avversi sulla crescita degli organismi. Sono state poi successivamente selezionate dieci femmine per monitorare la produzione giornaliera di uova e pellet fecali.

EHS e OCT hanno influenzato negativamente il metabolismo e la riproduzione di *A. tonsa*, in quanto entrambe le sostanze hanno portato a un decremento della produzione di uova e di pellet fecali. Nel caso di EHS la differenza fra controllo e concentrazione maggiore è risultata statisticamente significativa. I trend osservati sono stati interpretati utilizzando la teoria del Dynamic Energy Budget.

La presenza ubiquitaria dei filtri solari e gli elevati flussi turistici balneari, possono comportare il raggiungimento di concentrazioni dannose di OCT e EHS nelle acque marine costiere, influenzando negativamente la riproduzione e nutrizione di specie sensibili con ripercussione sul resto della comunità marina.

1. INTRODUZIONE

1.1 Inquadramento problema e scopo della tesi

Nel 2014, l'utilizzo globale di prodotti contenenti filtri UV era stimato tra le 16.000 e 25.000 tonnellate (De Miranda et al., 2021). Data la crescente preoccupazione per la fotocarcinogenesi e il fotoinvecchiamento legati all'esposizione solare, il consumo di cosmetici negli anni ha avuto un grande incremento, attualmente si stima infatti un quantitativo annuo di 10 milioni di tonnellate di filtri UV prodotti per il mercato globale (Hodge, 2025). Ne consegue un alto rischio di immissione in ambiente, soprattutto in zone soggette a elevata pressione turistica. Considerando le linee guida sull'applicazione delle creme solari, Danovaro et al. (2008) hanno stimato un potenziale rilascio in acqua di 4000-6000 tonnellate annue nelle zone di barriera corallina. In uno studio condotto su tre località balneari della costa francese, gli autori hanno calcolato che un'affluenza media di 3.000 bagnanti al giorno comporta il rilascio in acqua di un quantitativo di 52 kg di prodotti solari (1,4 t al mese) (Labille et al., 2020).

I filtri UV sono contenuti nelle creme solari principalmente, ma anche in altri tipi di cosmetici, detergenti, disinfettanti, materie plastiche etc. per preservare pigmenti e polimeri dalla fotodegradazione (Kwon et al., 2021; Picone et al., 2025). Il loro ingresso in ambiente acquatico avviene in modo diretto e indiretto. La fonte diretta consiste nel rilascio delle sostanze dalla pelle o dai vestiti a seguito dell'uso ricreativo delle acque, mentre la fonte indiretta è dovuta allo scarico di acque da impianti di trattamento. I quantitativi riscontrati presso località turistiche variano sia stagionalmente che giornalmente in base ai momenti di maggior afflusso, indicando la dipendenza fra concentrazione e sorgente diretta (Labille et al., 2020; Cadena-Aizaga et al., 2022).

Il maggior impatto per l'ambiente sembra essere quello diretto, anche se i filtri UV possono accumularsi negli influenti degli impianti di depurazione in quantitativi molto elevati. Nello studio di Cadena-Aizaga et al. (2022) sono riportati quantitativi di octocrilene (un tipo di filtro UV) di $12.327 \mu\text{g d}^{-1}$ ogni 1.000 abitanti. Gli autori hanno poi analizzato gli effluenti riportando una percentuale di abbattimento minima del 17% e massima del 100% in base al tipo di composto e al trattamento applicato. La rimozione totale dei filtri UV si è riscontrata negli impianti con trattamento terziario, mentre il trattamento secondario a fanghi attivi ha mostrato una rimozione incompleta (Cadena-Aizaga et al., 2022).

Per quanto riguarda la diffusione dei filtri UV, queste sostanze si sono rivelate ubiquitarie, la loro presenza non è limitata alle sole zone costiere e balneari, sono state infatti rilevate anche in aree remote e disabitate, come le regioni antartiche (De Miranda et al., 2021).

Molti ingredienti di prodotti cosmetici possono essere persistenti e potenzialmente tossici, con conseguenti impatti negativi per gli organismi acquatici (Mota et al., 2025). La scarsa propensione alla degradazione biologica, l'elevato valore di K_{ow} e la presenza ubiquitaria, rendono i filtri UV contaminanti emergenti che destano crescente preoccupazione. Sebbene molti studi ecotossicologici indichino che le soglie di tossicità acuta si attestino su valori di concentrazioni molto superiori a quelli riscontrabili in ambiente, i test cronici hanno evidenziato effetti marcati di tossicità su sviluppo e riproduzione come stress ossidativo, genotossicità e bioaccumulo.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è determinare l'impatto di etilesil salicilato (EHS) e octocrilene (OCT) – due filtri solari ampiamente utilizzati nella cosmesi – su riproduzione e alimentazione del copepode calanoide *A. tonsa*.

1.2 I filtri UV

Recenti evidenze suggeriscono che i benefici dell'esposizione solare vadano ben oltre la sintesi di Vitamina D, includendo la prevenzione di diverse forme tumorali e patologie croniche come la sclerosi multipla e il diabete. Tali effetti protettivi sono mediati da complessi meccanismi biochimici e di immunomodulazione, come la produzione di la melatonina, la serotonina e la regolazione dei ritmi circadiani (Van der Rhee et Coebergh, 2016).

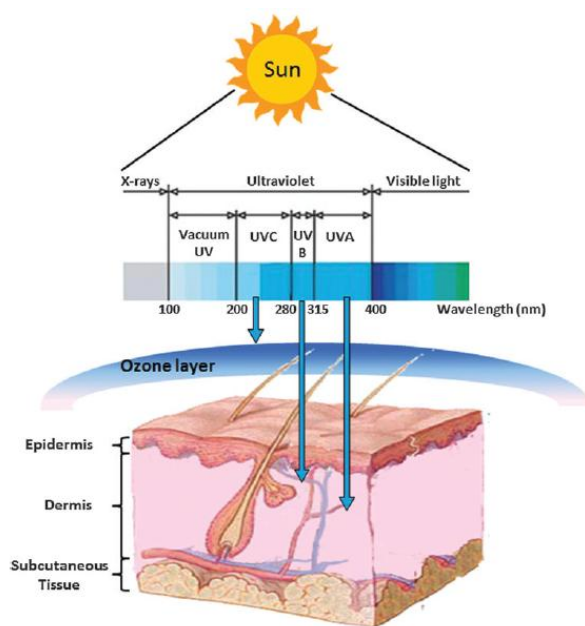


Figura 1.1 - Spettro della radiazione solare con rispettive lunghezze d'onda. UVC vengono schermati dallo strato di ozono, UVB raggiungono la pelle, UVA entrano più in profondità, in quanto la penetrazione aumenta con la lunghezza d'onda. (Gupta et al., 2013).

La figura 1.1 schematizza la radiazione solare incidente sul pianeta, in un spettro di lunghezze d'onda compreso tra 290 e 2.500-3.000 nm (inclusa la frazione infrarossi). Come si può notare, la porzione di raggi UV che interessa la superficie terrestre è limitata a un intervallo di 280-400nm.

Gran parte della radiazione solare dannosa per la vita sulla terra viene bloccata dallo strato di ozono (come i raggi UVC) ma altri raggi non vengono schermati, come gli UVB e UVA. I raggi UVB comportano carcinogenesi, gli UVA entrano più profondità nella pelle portando alla formazione di radicali liberi che concorrono a danneggiare il DNA.

Il riconoscimento dei raggi UV come principale causa ambientale di carcinomi cutanei ha portato, negli ultimi decenni, all'implementazione di massicci programmi di prevenzione primaria (Van der Rhee et Coebergh, 2016). Lo scopo dei filtri solari nelle creme è appunto quello di minimizzare o annullare i danni causati dall'esposizione solare, che possono essere distinti in danni acuti (eritema solare, ustione) o cronici (tumore cutaneo, fotoinvecchiamento, danni oculari).

I filtri solari si distinguono in due grandi categorie per funzionamento e caratteristiche chimiche:

- **Filtri fisici o minerali:** oppongono una barriera al passaggio della radiazione; riflettono la luce o la disperdono;
- **Filtri chimici o organici:** assorbono l'energia e la ri-emettono sotto altre forme (vibrazionale, rotazionale, infrarossa).

Nella tabella 1.1 sono riportate le caratteristiche del filtro UV ideale, le evidenziazioni in giallo indicano i parametri che concorrono a definire le sostanze come potenzialmente PBT (Persistenti, Bioaccumulabili e Tossiche).

CHIMICO-FISICHE	SICUREZZA (UMANA – AMBIENTALE)
<ul style="list-style-type: none"> • Assorbimento massimo nelle regioni UVA-UVB • Stabile e fotostabile • Non volatile • Solubile nei comuni veicoli oleosi • Compatibilità con altri ingredienti della formulazione cosmetica • Efficacia a basso dosaggio • Inodore, incolore, insapore 	<ul style="list-style-type: none"> • Penetrazione cutanea minima • Assenza di effetti dermatossici • Resistente alle secrezioni • Ecocompatibile • Non deve macchiare pelle o tessuti

Tabella 1.1 - Caratteristiche del filtro UV ideale secondo D'Agostinis et al. (Manuale cosmetologo, 2007). In giallo sono evidenziate le caratteristiche che suggeriscono un potenziale rischio di persistenza e bioaccumulo.

Dato che ogni filtro UV ha un picco di assorbimento caratteristico, per garantire la copertura da entrambe le radiazioni ultraviolette, le formulazioni prevedono l'utilizzo di combinazioni di almeno due filtri, talvolta sono solo filtri organici, in altri casi vi sono sia organici che fisici per garantire un alto grado protettivo (D'Agostinis et Mignini, 2007).

Il grafico nella figura 1.2 illustra la frequenza dei filtri UV nei prodotti solari utilizzati da bagnanti in tre località turistiche della costa francese. Esaminando gli ingredienti dei cosmetici, gli autori hanno riscontrato che i produttori prediligono l'utilizzo di filtri organici per le creme solari (Labille

et al., 2020). Evidenziati in rosso, ci sono i due filtri UV analizzati in questo lavoro di tesi, octocrilene e etilesil salicilato (qui nominato come “octisalate”, uno dei suoi nomi comuni), che si collocano al terzo e quarto posto per ordine di frequenza.

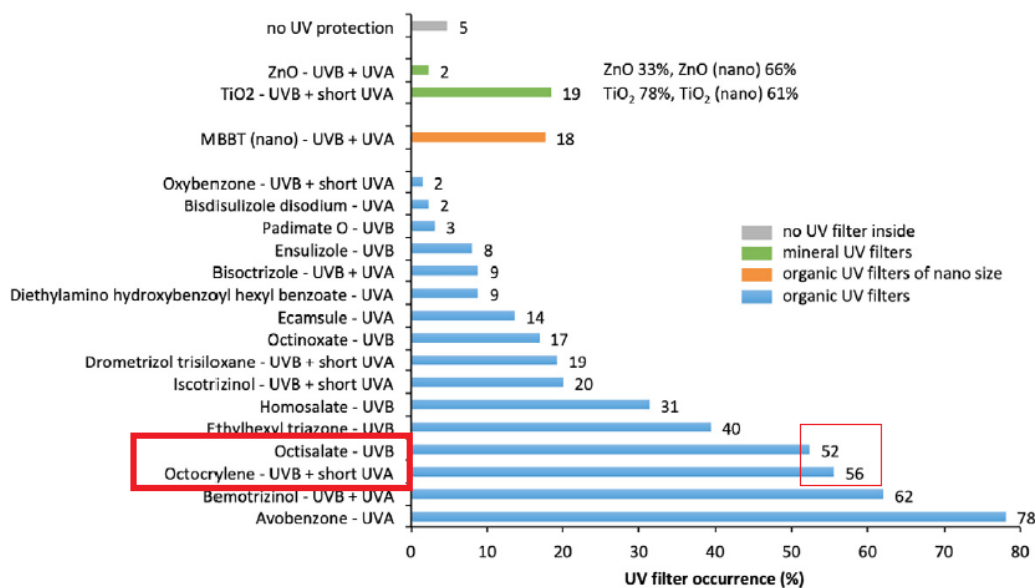


Figura 1.2 - Frequenza dei filtri UV rinvenuti in 124 prodotti solari usati dai bagnanti in tre località balneari francesi. Per ogni filtro UV è indicato il range UV di protezione. Nei riquadri in rosso sono evidenziati i filtri UV oggetto di questo lavoro di tesi con i rispettivi range di protezione: octocrilene (octocrylene) e etilesil salicilato(octisalate) (Labille et al., 2020).

In allegato I sono riportate: il sistema di etichettatura, la formulazione tipo di una crema solare e alcune liste di ingredienti di prodotti fotoprotettivi disponibili in commercio.

1.2.1 Etilsil salicilato

L'etilesil salicilato è un estere derivato dall'acido salicilico, il cui nome IUPAC è 2-etilesil-2-idrossibenzoato. Nella figura 1.3 si può osservare la sua formula di struttura.

Nell'allegato VI del regolamento europeo (CE) n. 1223/2009, l'utilizzo massimo previsto per EHS è del 5%, soglia ritenuta sicura per la salute umana. Recentemente però tutto il gruppo di esteri salicilici utilizzato come filtri, risulta essere sotto esame da parte di ECHA (European Chemical Agency) che ha richiesto dei controlli e test ai produttori di questa tipologia di filtri UV. Alcuni stati hanno richiesto una revisione della regolamentazione, chiedendo una restrizione all'uso di EHS in quanto valutato con le seguenti indicazioni di rischio: H361d “sospettato di nuocere al feto” e H410 “Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata”.

EHS si trova attualmente in un contenzioso giuridico fra l'azienda Symrise, azienda produttrice di materie prime per la cosmesi, e ECHA. Data la sospetta tossicità di EHS, ECHA ha richiesto ulteriori indagini alle aziende al fine di garantire la sicurezza dei lavoratori che maneggiano questo

tipo di sostanza, in particolare ha richiesto che l'azienda fornisca informazioni di tossicità di EHS sui vertebrati. Symrise si è appellata al divieto di test su animali, considerando l'uso di EHS solo per prodotti cosmetici e definendo illegale la richiesta (*Symrise v ECHA*, T-655/20). La prima sentenza è a favore di ECHA in quanto la salvaguardia dei lavoratori risulta prioritaria rispetto sul diritto di sperimentazione animale. Essendo il contenzioso non ancora risolto, visto il ricorso in appello dell'azienda, gli organi regolatori potrebbero optare per un ban preventivo della sostanza in questione, nel caso di impossibilità di ottenimento di dati sulla tossicità.

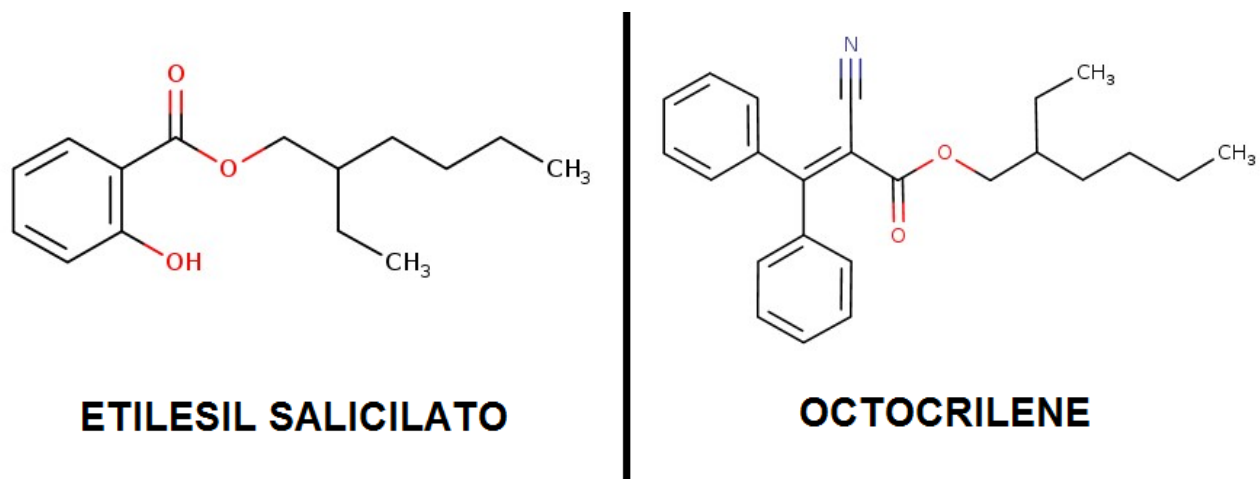


Figura 1.3 - Formule di struttura di EHS (sx) e OCT (dx) (fonte <https://chem.echa.europa.eu/> accesso 20/02/2026).

1.2.2 Octocrilene

L'octocrilene (o ottocrilene) (OCT) è un filtro UVB liquido e liposolubile per formulazioni ad alto fattore di protezione (D'Agostinis et Mignini, 2007). Si tratta di un estere, il cui nome IUPAC è estere 2-etilesilico dell'acido 2-ciano-3,3-difenilacrilico (2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylprop-2-enoate) (figura 1.3).

Il massimo quantitativo nelle creme solari è 10% secondo l'attuale regolamento (CE) n. 1223/2009 (allegato VI), per cui OCT è ritenuto sicuro fino a tale concentrazione se usato singolarmente. Nell'ultimo periodo, questa sostanza è stata oggetto di pesanti revisioni e controllo, date le indicazioni di rischio per OCT che sono: H361f "sospettato di nuocere alla fertilità" e H410 "Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata". Lo scorso settembre la Francia e ECHA hanno proposto una severa restrizione all'uso di OCT, proponendo un limite massimo di 0,001 % w/w (ECHA, 2025).

Nella tabella 1.2 sono riassunte le caratteristiche e l'identificazione di octocrilene e etilesil salicilato.

Nome (abbreviazione)	Nomi comuni e commerciali	CAS n.	Eu n.	Log K _{ow} (T=25°)	Solubilità (µg L ⁻¹)	Tempo di dimezzamento in acqua	Indicazioni di pericolo (Hazards statements)
Octocrilene (OCT)	<ul style="list-style-type: none"> • Ottocrilene • Parsol[®]340 	6197-30-4	228-250-8	7,14	40 (pH=6,2)	501,87 h	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H361f ▪ H410
Etilsil salicilato (EHS)	<ul style="list-style-type: none"> • Octisalate • Octyl salicylate • Sunobel[®]OS 	118-60-5	204-263-4	5,7	74,4 (pH=7,1)	364,27 h	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H361d ▪ H410

Tabella 1.2 - Caratteristiche chimico-fisiche di OCT e EHS (<http://echa.europa.eu>, accesso 15/12/2025). Dati log K_{ow} e tempo di dimezzamento da D'Amico et al., 2022.

1.3 La specie test:

I Copepodi sono una classe di crostacei che conta moltissime specie. Sebbene ne esistano di ambiente dulciacquicolo, la maggior parte degli organismi abitano acque marine e oceaniche. Il ruolo ecologico dei Copepodi nelle comunità marine è molto importante, in quanto si collocano fra i produttori primari e gli organismi dei livelli trofici superiori (Wollenberger, 2005). La maggior parte dei Copepodi si alimenta di fitoplancton, utilizzando una sorta di filtro di setole intrecciate, derivato da arti modificati, con cui selezionano le cellule algali (Barnes et Hughes, 1990). Non sono solo pascolatori ma anche predatori e detritivori. Nell'ordine dei Calanoidi vi sono specie che cambiano abitudini nutrizionali passando da erbivori a onnivori come risposta alla differente disponibilità di cibo: possono infatti predare organismi del micro-zooplancton, come ciliati, nauplii di altri Copepodi e rotiferi (Keppel, 1993).

Essendo i Copepodi a loro volta predati da larve di pesci e crostacei, sono da considerarsi una importante risorsa alimentare per la sopravvivenza di specie dei livelli trofici superiori. Il loro impiego in acquacoltura come cibo vivo, permette di fornire gran parte degli elementi nutrizionali per l'allevamento di specie ittiche di pregio, come ad esempio crostacei (*Menippe mercenaria* – “Florida Stone Crab”) (Marcus et Wilcox, 2007) o pesci marini come il tonno rosso (*Thunnus thynnus*) (Rasdi et Qin, 2016), (Betecor et al., 2019).

Per testare gli effetti dei filtri UV octocrilene e etilesil-salicilato, è stata scelta la specie test *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849), un crostaceo copepode appartenente all'ordine dei Calanoidi, la cui tassonomia completa è riportata nella tabella 1.3.

CLASSE	<i>Copepoda</i>
INFRACLASSE	<i>Neocopepoda</i>
SUPERORDINE	<i>Gymnoplea</i>
ORDINE	<i>Calanoida</i>
FAMIGLIA	<i>Acartiidae</i>
GENERE	<i>Acartia</i>
SOTTOGENERE	<i>Acartia (Acanthacartia)</i>
SPECIE	<i>Acartia (Acanthacartia) tonsa</i>

Tabella 1.3 - Tassonomia completa della specie test (*A. tonsa*).

Le specie del genere *Acartia*, sono ben distribuite a livello mondiale, in acque costiere marine e salmastre (Wollenberger, 2005). Si trovano generalmente a profondità da 0 a 20 m e resistono ad ampie variazioni di salinità e temperatura (Marcus et Wilcox, 2007).

1.3.1 Elementi morfologici, biologici ed ecologici della specie test

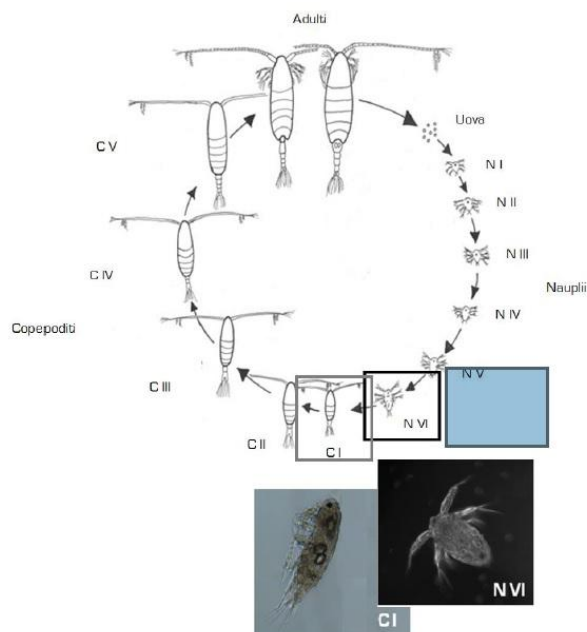


Figura 1.4 – Stadi naupliari e Copepodita di *A. tonsa* (fonte: ISPRA 2022).

Come illustra la figura 1.4, *A. tonsa* conta sei stadi larvali da uovo a nauplio (NI a NVI) e cinque stadi di Copepodite (CI a CV). I naupli hanno forma triangolare e aspetto molto diverso rispetto agli adulti. Ad ogni muta la loro dimensione aumenta progressivamente e prendono forma le appendici toraciche e mandibolari che sono necessarie per muoversi e nutrirsi (lo stadio NI ne è privo). I Copepoditi sono più piccoli degli adulti ma presentano morfologia simile, si possono distinguere gli elementi distintivi sessuali, i metameri e le appendici. Con la muta dello stadio CV si sviluppa l'adulto, con le

appendici completamente formate (Buttino et al., ISPRA 2022).

I Copepodi come *A. tonsa* hanno un corpo suddiviso in metameri, formato da *prosoma* (capo e *metasoma* o torace) e *urosoma* (addome). Il *prosoma* porta due paia di antenne, le appendici mandibolari e toraciche. Le prime antenne sono molto lunghe, quasi quanto la lunghezza del corpo, e fungono da arti di movimento e sensoriali, grazie alle setole di cui sono dotate. Sul capo si distingue un unico occhio e un rostro biforcuto.

Non tutte le specie di Copepodi presentano spiccato dimorfismo sessuale, ma in *A. tonsa* i sessi sono facilmente distinguibili. Le femmine sono più grandi, di dimensioni di 1-1,5 mm, con le prime antenne dritte. I maschi raggiungono invece lunghezze inferiori, di circa 0,8-1 mm, e si possono osservare con le prime antenne ripiegate, vengono infatti utilizzate per afferrare la femmina e inserire la spermatofora durante la copulazione. Le differenze fondamentali per distinguere i due sessi sono l'*urosoma*, il quinto piede e le antenne. Come si può osservare nella figura 1.5, nelle femmine il primo segmento addominale è più grande e unito (B), mentre nei maschi risulta più stretto (E), inoltre questi ultimi hanno l'ultima appendice natatoria modificata per l'atto riproduttivo (F).

Dopo la fecondazione, le uova vengono rilasciate direttamente nella colonna d'acqua. Si stima che una femmina possa produrre una media di 18-50 uova ogni 5-6 giorni (Marcus et Wilcox, 2007).

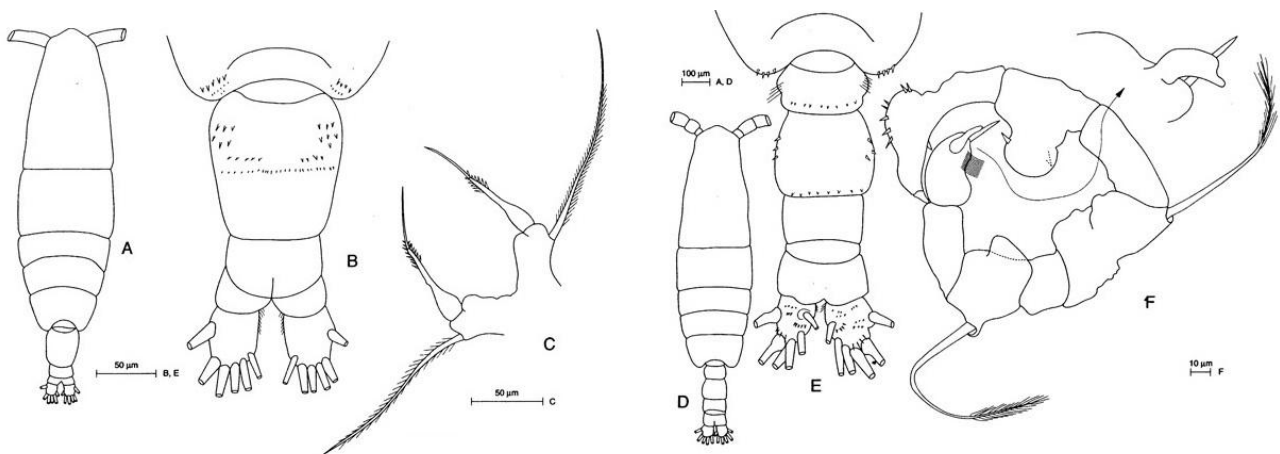


Figura 1.5 - Illustrazioni degli elementi caratteristici del dimorfismo sessuale di *A. tonsa*. Femmina: A- individuo intero; B - dettaglio urosoma; C - appendici finali; Maschio: D - individuo intero; E - dettaglio urosoma; F - appendice finale uncinata. (Fonte: M.G. Mazzocchi, G. Zagami, A. Ianora, L. Guglielmo & J. Hure in *Atlas of Marine Zooplankton Straits of Magellan. Copepods*. L. Guglielmo & A. Ianora (Eds.), 1995. [p.67, Fig.3.7.1].)

1.3.2 Il copepode *A. tonsa* come bioindicatore

Un bioindicatore è un organismo (o una parte di esso) in grado di riflettere lo stato di salute di un ecosistema attraverso modificazioni misurabili e chiaramente identificabili delle proprie funzioni vitali. La scelta del bioindicatore è perciò una scelta critica strettamente legata allo scopo e all'oggetto di indagine.

A. tonsa è ampiamente utilizzata come specie test, il suo impiego nei saggi ecotossicologici è descritto dai protocolli di riferimento internazionali ISO. Nella tabella 1.4 vengono riassunti le caratteristiche che rendono *A. tonsa* un'ottima specie indicatrice (Labille et al., 2020; Picone et al. 2021; Picone et al. 2022; Picone et al. 2025).

I protocolli di riferimento internazionali ISO prevedono l'utilizzo di *A. tonsa* per il test acuto di mortalità (ISO, 1999) e per il test di sviluppo larvale (ISO, 2015), sviluppato a partire dai protocolli messi a punto in Danimarca da DTU (Technical University of Denmark) e DHI (Danish Hydraulic Institute) (Andersen et al., 2001).

Proposte di metodi per valutare gli effetti a lungo termine sono state presentate da Kusk et Wollenberger (2007), e sono state recentemente utilizzate per sviluppare test cronici per valutare sostanze pure (Picone et al., 2022). Per i sedimenti ci sono due protocolli pubblicati (Picone et al., 2018; Buttino et al., 2018).

SENSIBILITÀ	Risulta sensibile a diverse classi di contaminanti con possibilità di eseguire test acuti e cronici e misurazione di molteplici endpoint.
REPERIBILITÀ	Ampia distribuzione lungo le coste dell'oceano Atlantico, in Europa e nel Mediterraneo. Abbondante fra le specie dello zooplacton in ambienti estuarini e costieri.
ALLEVABILITÀ	Facilmente allevabile in laboratorio.
RILEVANZA ECOLOGICA	Sono consumatori di fitoplancton e detrito e risorsa alimentare per altri invertebrati e vertebrati. Essenziale ruolo trofico per valutare effetti a livello di comunità o potenziale rischio biomagnificazione.
POSIZIONE	Si trovano principalmente negli strati superficiali delle acque, dove si presume di concentrino i filtri UV.
CONOSCENZA	Biologia ed ecologia della specie sono molto documentate.
CICLO VITALE	Il ciclo vitale breve permette di condurre test cronici ed esaminare effetti sub-letali.

Tabella 1.4 – Elenco delle caratteristiche della specie bioindicatrice *A. tonsa* utilizzata in questo lavoro di tesi. Nella colonna di destra è riassunta la spiegazione di ogni elemento.

1.4 Elementi della teoria Dynamic Energy Budget – DEB (Kooijman, 2010)

La teoria del Dynamic Energy Budget (DEB), sviluppata per la prima volta da Kooijman nel 1979, descrive l'organismo come un sistema aperto che scambia energia e massa con l'esterno. La teoria si fonda sul principio per cui energia e massa sono quantità conservative: i processi di conversione dell'energia portano a dissipazione, mentre il loro trasporto avviene attraverso le superfici di scambio, in questo caso membrane cellulari, lume intestinale etc. (Klok, 2012). Tale approccio permette di semplificare le relazioni fra uptake e utilizzo di energia, riducendo l'organismo a una schema a due compartimenti: struttura ed energia (Baas, 2018). La teoria DEB definisce tre stadi principali del ciclo di vita: l'embrione, che basa il suo sviluppo sulle riserve ricevute; lo stadio giovanile che si nutre ma non si riproduce; e lo stadio adulto, in grado di riprodursi. Il vantaggio di questo tipo di modello è che non è specie-specifico ed è funzionale a molti organismi eterotrofi. Ponendo il focus esclusivamente sui flussi energetici, il modello permette di tralasciare numerose variabili secondarie che renderebbero troppo complessa l'analisi di scenari critici, come nel caso dell'esposizione a sostanze tossiche.

Nei test ecotossicologici, parametri quali sviluppo, riproduzione e mortalità vengono esaminati in base alle risposte di organismi all'esposizione di diversi tipi di campioni, allo scopo di prevedere rischi ed effetti a livello ecosistemico. Ne consegue che la teoria DEB può favorire la comprensione globale degli effetti tossico-cinetici, permettendo di estrapolare ulteriori informazioni e definire i risultati di tossicità in modo più integrato con il contesto ecologico (Klok, 2012).

Nella figura 1.6 è illustrato il funzionamento del modello. Le frecce indicano i flussi di energia e materia, mentre nei riquadri vi sono le variabili di stato che sono: riserve, mantenimento, struttura, mantenimento della maturità e riproduzione (Baas, 2028). Le variabili di stato definiscono lo stadio in cui si trova l'organismo e i relativi flussi energetici; l'energia viene ripartita nei vari compartimenti seguendo una gerarchia di priorità legata alla sopravvivenza dell'individuo. La fonte di energia per gli eterotrofi deriva dal cibo, che viene in parte assimilato e in parte escreto, e l'energia ricavata è stoccata in riserve.

L'energia accumulata segue quindi due canali principali: mantenimento e mantenimento della maturità secondo la cosiddetta “ κ -rule”, che stabilisce come viene ripartita l'energia.

Inizialmente l'embrione utilizza tutta la riserva contenuta nell'uovo, poi dalla nascita fino all'età di maturazione sessuale, l'energia viene ripartita con una quantità indicata con κ fra mantenimento somatico delle strutture esistenti per la crescita. Al raggiungimento della maturità sessuale, una quota di κ viene investita nella riproduzione ($1-\kappa$), attivando il canale dedicato al mantenimento della maturità.

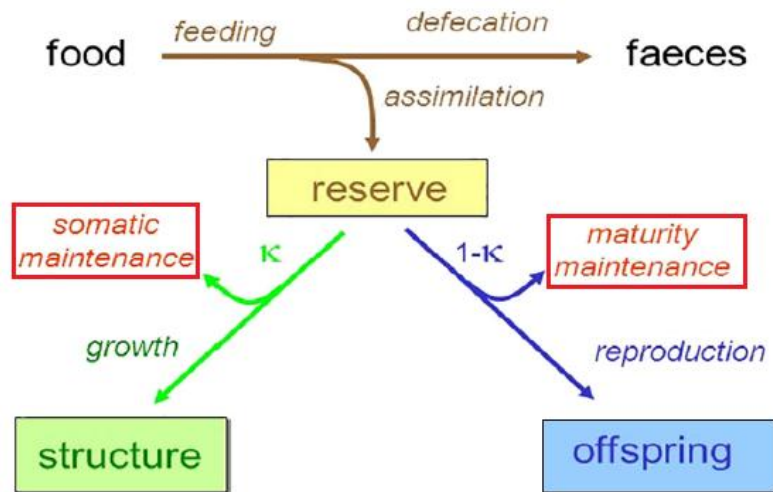


Figura 1.6 - Rappresentazione schematica del modello DEB. I riquadri indicano le variabili di stato dell'individuo, mentre le frecce i flussi di energia di ciascun processo (Baas, 2018).

A questo punto, è necessario fare una distinzione terminologica, in quanto l'accezione utilizzata dal modello differisce parzialmente da quella biologica:

- **CRESCITA** = indica l'incremento quantitativo di volume o della massa dell'organismo attraverso la sintesi di nuove strutture (tessuti, muscoli, scheletro).
Esempio: avannotto che aumenta la sua lunghezza di un centimetro.
- **SVILUPPO** = si riferisce alla "maturazione", un concetto di natura qualitativa che indica l'aumento della complessità strutturale e morfologica.
Esempio: maturazione sessuale.

Come accennato in precedenza, l'energia è ripartita secondo priorità ben definite. Il mantenimento somatico ha la priorità sulla crescita, esattamente come il mantenimento della maturità ha la priorità sulla riproduzione. L'energia destinata allo sviluppo negli embrioni e negli stadi giovanili è ripartita in modo analogo tra il mantenimento della maturazione già acquisita e l'incremento del grado di maturità.

Quando gli organismi a crescita limitata raggiungono la maturazione, l'energia adibita alla crescita viene trasferita al mantenimento della maturità. Gli organismi a crescita continua invece mantengono una componente κ che può essere usata ancora per la crescita, investendo contemporaneamente una quota $1-\kappa$ per la riproduzione. Essendo però che il mantenimento è collegato al volume dell'individuo, all'aumentare del volume aumenta l'energia necessaria per il

mantenimento somatico, perciò l'organismo arriva a un punto tale per cui gran parte dell'energia κ deve essere stoccata per il mantenimento e non ne rimane a sufficienza per la crescita che ha quindi un arresto.

Poiché un organismo può continuare a riprodursi anche in condizioni di scarsità di cibo, la teoria introduce il concetto di "riserve". Qualora l'individuo sia sottoposto a uno stress, come l'esposizione a un contaminante, la riproduzione può avvenire comunque se le riserve di energia sono sature. In taluni casi si può osservare un lag temporale, in cui lo squilibrio energetico causato dallo stress non si traduce subito in un effetto sulla riproduzione.

Il modello si rivela utile per spiegare e definire situazioni borderline di tossicità e per estrapolare maggiori informazioni dai test ecotossicologici. Questo strumento può essere utile per inquadrare le problematiche ambientali coadiuvando i dati di tossicità con la teoria del DEB, per avere una visione globale più completa degli effetti tossici dei contaminanti sulle comunità.

1.4.1 Ipotesi di applicazione del DEB a *A. tonsa*

Il seguente paragrafo è un esempio concettuale di applicazione della teoria allo sviluppo del copepode *A. tonsa*.

Nello stadio giovanile di nauplio III, l'energia assimilata viene allocata innanzitutto per il mantenimento somatico delle strutture esistenti. Solo in presenza di surplus energetico, la quota restante è destinata all'accrescimento e alla maturazione necessaria per la muta allo stadio IV. Se si introduce uno stress chimico, come nel caso di esposizione a un metallo pesante, la quantità di energia richiesta per il mantenimento aumenta, in quanto si attivano i processi metabolici supplementari per la detossificazione. Questo surplus di costi sottrae energia alla crescita determinando un arresto o un significativo ritardo nello sviluppo.

Una situazione analoga si riscontra nell'individuo adulto. Quando gli organi sessuali si sono sviluppati, l'energia $1-\kappa$ è utilizzata per il mantenimento di tali strutture e il surplus energetico è investito nella riproduzione con l'effettiva produzione di gameti. Nel caso in cui un contaminante comporti uno squilibrio energetico, una quota di energia è sottratta dalla riproduzione per essere utilizzata per il mantenimento della maturità, ossia per tutte le strutture complesse che compongono l'adulto.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Allevamento di *Acartia tonsa* in laboratorio

Gli organismi utilizzati per le prove di tossicità provengono da una coltura mantenuta secondo la procedura descritta in (Picone et al. 2021; Picone et al. 2022), presso il laboratorio di ecotossicologia dell'Università Ca' Foscari (Venezia, Italia). La coltura d'origine è stata fornita dall'azienda Guerne Sea Farm (UK).

Il medium di coltura è stato ottenuto diluendo una soluzione ipersalina (10%) di acqua marina ricostituita con medium M7 Elendt in rapporto 1:4. La soluzione ipersalina permette, con opportuna diluizione, di ottenere un medium della salinità desiderata, mentre la soluzione M7 contiene tutti gli elementi in traccia necessari per il corretto sviluppo di *A. tonsa*. Entrambe sono state preparate secondo la norma ISO 16778:2015. Per il mantenimento si è scelta la salinità di 20‰, la stessa alla quale sono stati svolti i test di tossicità.

In bottiglie di 2 L, riempite con 1,8 L di medium, è stato inserito un numero di circa 600-800 uova per iniziare una nuova coltura. Le bottiglie sono state mantenute a una temperatura di $20\pm 1^\circ\text{C}$ per tutto il periodo di accrescimento, in apposite camere termostatiche, con un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio. Una leggera agitazione per mezzo di pipette pasteur in vetro, collegate a sistema di aerazione filtrata, ha permesso di mantenere in sospensione l'alimento per i copepodi, garantendo anche gli scambi gassosi e un'ossigenazione adeguata ($>4 \text{ mg L}^{-1} \text{ OD}$).

I copepodi sono stati nutriti con un mix di tre alghe marine flagellate:

- *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher 1959 – **Chlorophyta**
- *Diacronemalutheri* (Droop) Bendif&Véron, 2011 (ex *Pavlova lutheri* (Droop) J.C. Green, 1975 – **Haptophyta**
- *Tisochrysis lutea* El M. Bendif&I. Probert, 2013 – **Haptophyta**

Tetraselmis suecica presenta un profilo nutrizionale equilibrato, fornendo proteine, carboidrati e fibre e in parte acidi grassi, con un apporto però inferiore rispetto ad altre specie (Pereira et al., 2019). Per evitare carenze, è auspicabile una dieta composta da più specie algali, in modo siano forniti i nutrienti necessari per un migliore allevamento dei copepodi (Rasdi et Qin, 2016). Si aggiungono quindi *Diacronemalutheri* (ex *Pavlova lutheri*) che produce alti quantitativi di acidi grassi polinsaturi, in particolare gli essenziali Omega-3 acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA) (Yang et al., 2020), e *Tisochrysis lutea*, largamente utilizzata come alimento nell'acquacoltura di molluschi e crostacei (García-García et al., 2024), grazie agli alti tassi

di produzione di DHA e fucoxantina. Le colture algali sono state allestite in condizioni di temperatura e fotoperiodo identiche alla coltura di *A. tonsa* ($T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperiodo 16:8 L/B). Ciascuna specie algale è stata posta in una beuta da 500 mL, con medium Guillard's F/2 (Guillard, 1975), che consiste in acqua marina ricostituita con aggiunta di nutrienti (sali di nitrato, fosfato e silicato) e oligoelementi in traccia, quali metalli e vitamine. Le beute sono state posizionate su un agitatore orbitale per evitare la decantazione delle alghe.

L'alimento è stato somministrato ai copepodi quattro volte al giorno per mezzo di una pompa peristaltica collegata a un timer in modo da mantenere una densità algale minima di 10^3 cellule mL^{-1} giorno⁻¹. Il mix algale è in rapporto 2:2:1 rispettivamente *Tisochrysis* : *Diacronema* : *Tetraselmis*.

Sebbene *A. tonsa* possa vivere e riprodursi a salinità da 15‰ a 35‰ (ISO, 2015) e tollerare intervalli di temperatura nel range 0-30 °C (Marcus et Wilcox, 2007), l'optimum per una rapida crescita si ha alle condizioni riportate sopra ($T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$; $S = 20\text{‰}$), alle quali gli organismi crescono con lo sviluppo larvale che si completa in 5-6 giorni e il raggiungimento dello stadio riproduttivo che avviene dopo circa 10-12 giorni (Marcus et Wilcox, 2007; Picone et al., 2025).

Le bottiglie con le colture di copepodi sono state pulite regolarmente per rimuovere uova, larve e detrito accumulato sul fondo. La rimozione delle uova è fondamentale per evitare il sovraffollamento della coltura che comporterebbe stress per gli organismi, il rischio di una limitazione del cibo e un inquinamento per eccessivo carico organico. Per sifonare si è utilizzata una pipetta in vetro con un pezzo di tubo di gomma terminale, collegata a una siringa per l'aspirazione. Si è proceduto delicatamente per staccare il materiale decantato senza schiacciare le uova o stressare gli adulti. Quando si è rimosso gran parte del sedimento, si utilizza la parte terminale di gomma per strofinare il fondo e rimuovere le uova adese più fortemente sul vetro. La quota aspirata viene successivamente filtrata attraverso due setacci a maglie di 170 μm e 50 μm . Il primo setaccio ritiene gli adulti che vanno rimessi nella coltura, le uova invece passano il primo setaccio ma vengono ritenute dal secondo. Con una spruzzetta contenente medium di coltura, le uova vengono dilavate dal setaccio e raccolte in bottigliette in vetro da 50 mL. Essendo uova subitane (si schiudono entro 24-48h), vengono conservate al buio a temperatura di 4°C, in modo da impedire la schiusa ed averle pronte all'uso. Possono essere conservate da due a sei settimane (Marcus et Wilcox, 2007), considerando che il successo nella schiusa decresce col passare del tempo (ISO, 2015).

L'allevamento dei copepodi è una pratica standard per i laboratori in cui si usano per eseguire i test. Tuttavia, è necessario seguire rigorosamente la routine delle pulizie e del mantenimento delle colture algali per mantenere produttive le colture. Per questo nuovi allevamenti vengono periodicamente preparati (ogni 4-5 settimane) per garantire la continuità.

La produzione di uova e la qualità delle stesse viene verificata costantemente, con controlli allo stereoscopio almeno 3 volte alla settimana, mentre la sensibilità di ogni coltura viene valutata ricorrendo a controlli negativi e positivi. In tabella 3.1 sono riassunte le indicazioni generali seguite per il mantenimento della coltura di *A. tonsa*.

L'allevamento in laboratorio avviene con successo seguendo le linee guida e i protocolli standard, però è soggetto a limitazioni per via dell'artificialità di soluzioni e condizioni fisiche a cui sono sottoposti gli organismi.

ELEMENTO	CONSIDERAZIONI
Età della coltura	Si è mantenuto un periodo di utilizzo di 6-7 settimane per evitare fenomeni di senescenza.
Mortalità	La mortalità della coltura deve essere bassa, un'elevata mortalità può indicare stress o un insufficiente ricambio generazionale.
Nutrizione	Tutti i copepodi devono potersi nutrire in modo adeguato, il cibo deve essere in quantità consona perché sia sempre facilmente raggiungibile. Una corretta nutrizione permette costanti livelli di produzione di uova.
Affollamento	Va evitato. Gli organismi non devono essere posti nelle condizioni di stress per la ricerca delle risorse per il loro accrescimento. Inoltre, un quantitativo eccessivo di organismi per litro comporta un sovraccarico dovuto ad accumulo di metaboliti.
Uova	La produzione di uova è indicatore della salute della coltura. Si deve controllare sia la quantità che la qualità delle uova, nonché il successo di schiusa.

Tabella 2.1 – Indicazioni generali per l'allevamento in coltura di *A. tonsa*.

2.1.1 Raccolta delle uova

Le uova vengono prelevate direttamente dalla coltura allevata in laboratorio se non sono state precedentemente raccolte e conservate alle condizioni sopracitate. Si sifona un quantitativo di circa 200 mL che viene filtrato con due setacci per separare le uova dai naupli e/o dagli adulti che vengono subito reinseriti nella bottiglia della coltura. Il setaccio con le uova è stato posizionato su una beuta a collo largo per facilitare le manovre di rimozione, dilavando le maglie con acqua ISO. A questo punto, agitando la beuta si estrae un volume noto con una micropipetta (solitamente 0,5-1 mL) e si filtra con un sistema di pompa a vuoto, composto da un bicchiere graduato, appoggiato su un setto poroso a forma di imbuto, con la base in silicone che si inserisce su una beuta da vuoto. Il filtro è posizionato sul setto poroso, si appoggia poi il bicchiere che viene agganciato per mezzo di una pinza di alluminio. Il filtro utilizzato è a membrana di cellulosa (Whatman[®], diametro 47 mm,

dimensioni dei pori 0,45 μm) dotato di griglia nera (quadrati da 3mm) per agevolare il conteggio delle uova. Il numero ottenuto verrà rapportato al volume filtrato, per avere un'idea della densità di uova presenti, estratte dalla coltura.

Il filtro è stato posizionato su una capsula di Petri inumidita con un po' di acqua marina ricostituita e si è proceduto all'osservazione per mezzo di stereomicroscopio (Stemi SV6, Zeiss, Germany).

Le uova di *A. tonsa* presentano forma sferica e dimensioni di circa 70-80 μm (Buttino et al., ISPRA 2022), con una colorazione caratteristica, azzurro-grigia. Le uova bianche o traslucide non vanno considerate in quanto potrebbero non essere state fecondate. Allo stesso modo le uova danneggiate o dai bordi schiacciati o frastagliati non devono essere contate. Nella figura 2.1 si può osservare come appare il filtrato della coltura allo stereomicroscopio. Si può notare un gruppo di uova idonee a destra, con la colorazione tipica delle uova di buona qualità. Altre uova idonee sono state evidenziate con un indicatore verde a stella e si trovano sparse per il quadrante. Le uova con a fianco il triangolo rosso sono invece da scartare. Si può notare in posizione centrale un uovo schiacciato mentre, in basso e a sinistra, sono presenti due uova bianche che potrebbero essere non fecondate. L'indicatore con triangolo giallo indica invece un uovo potenzialmente non idoneo, si possono infatti notare i bordi non regolari. Potrebbe essere danneggiato e quindi non schiudersi o potrebbe nascere una larva già compromessa. Cerchiato in azzurro si vede il profilo di un nauplio.

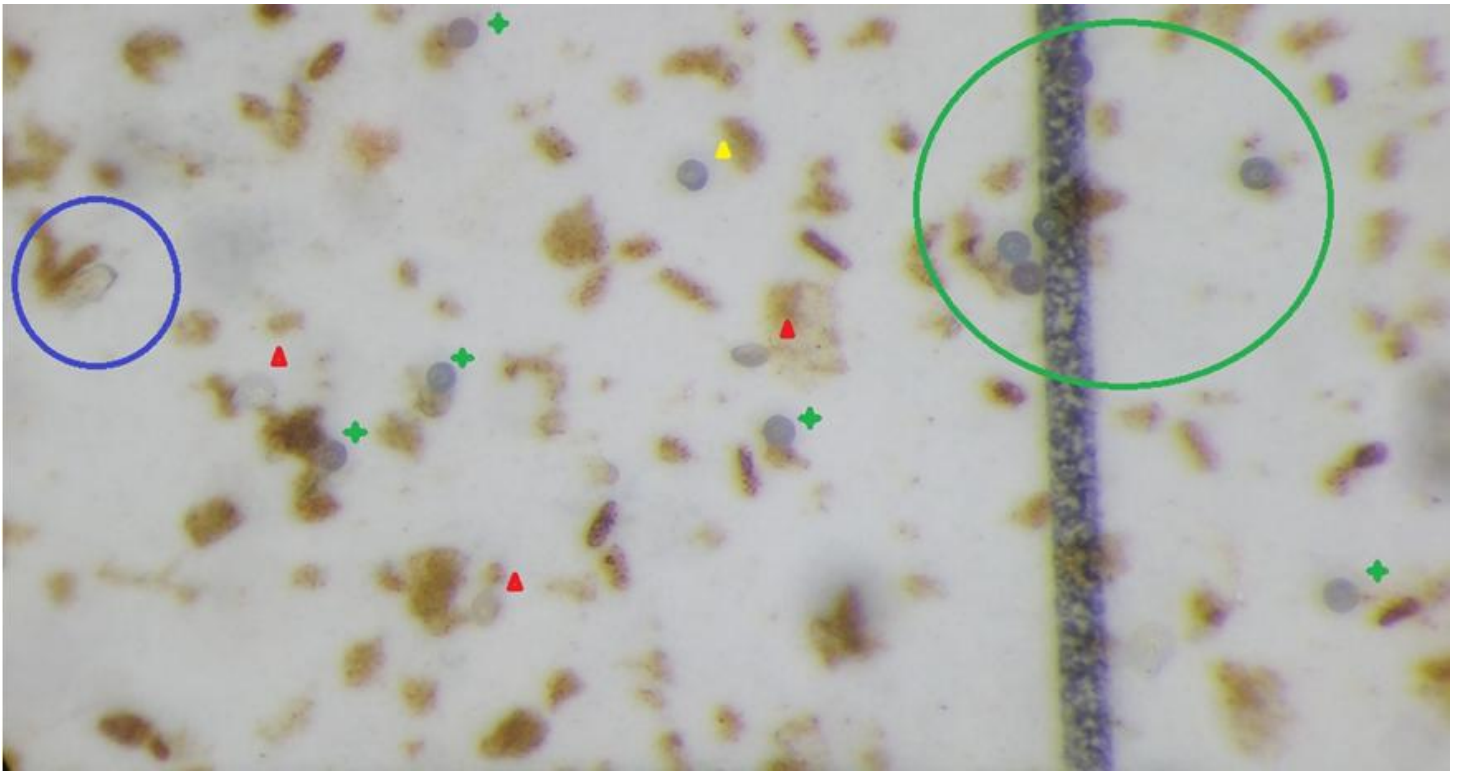


Figura 2.1 - Uova prelevate dalla coltura di *A. tonsa* allo stereomicroscopio. Un gruppo di uova idonee è stato cerchiato in verde. Altre uova utilizzabili sono state evidenziate con l'indicatore verde a stella. L'indicatore rosso a triangolo indica invece uova non idonee (non fecondate o già schiuse). L'indicatore giallo a triangolo indica un uovo probabilmente da scartare dai bordi non regolari. Un nauplio è stato cerchiato in blu.

2.2 Test di tossicità

La parte sperimentale del presente lavoro è articolata in due fasi, secondo il protocollo sperimentale messo a punto dal gruppo di ricerca del laboratorio di ecotossicologia dell'Università Ca' Foscari di Venezia. La prima parte consiste nel sottoporre un certo numero di organismi dalla schiusa delle uova fino al raggiungimento dello stadio riproduttivo. In questo modo, l'esposizione ha coinvolto i seguenti stadi di sviluppo:

- schiusa delle uova
- sviluppo naupliare
- sviluppo dei copepoditi
- raggiungimento dello stadio di adulto riproduttivo

Nella seconda parte, per riscontrare effetti di tipo cronico, sono state prelevate femmine riproduttive per evidenziare se e in che modo OCT e EHS hanno influenzato riproduzione e alimentazione. L'esposizione è avvenuta in condizioni semi-statiche, a concentrazioni crescenti di contaminate. Per misurare l'effetto tossico dei filtri UV sono stati utilizzati indicatori indiretti quali: il numero di uova prodotte per valutare la riproduzione; e il conteggio dei pellet fecali per l'alimentazione.

L'esposizione al contaminante è avvenuta secondo due possibili vie di ingresso: per contatto diretto e per ingestione. Gli organismi possono assorbire il contaminante attraverso le superfici respiratorie e l'epidermide nuotando nel mezzo acquoso, oppure con la digestione di microalghe contaminate che hanno assorbito il contaminante sulla superficie cellulare o all'interno della cellula stessa (Newman, 2015). Non è escluso che entrambe le modalità di ingresso si siano verificate, con influenze su vari aspetti del ciclo di vita del copepode calanoide *A. tonsa*.

Le condizioni del test nelle due fasi sono riassunte nella tabella 2.2.

	FASE 1	FASE 2
N. di uova/individui	300 uova	1 femmina per vial
Contenitore (volume)	Bottiglia – 500 mL	Vial – 30mL
Durata	10 giorni	4 giorni
Agitazione	1 rpm	Nulla
Temperatura	20 °C	20 °C

Tabella 2.2 - Condizioni operative del test nelle due fasi di esposizione di *A. tonsa* alle soluzioni con OCT e EHS.

2.2.1 Le soluzioni test

Le soluzioni madre sono state preparate utilizzando standard analitici di OCT e EHS diluiti in acetone, a causa delle caratteristiche idrofobiche dei suddetti filtri UV. Per minimizzare possibili effetti tossici dovuti a impurità nei reagenti (OECD, 2019), è stato utilizzato acetone ad elevata purezza (>99,5%).

Alcuni dei solventi suggeriti per i test in fase acquosa sono ad esempio acetone, etanolo, metanolo, acetonitrile. La concentrazione di solvente non deve eccedere le soglie di tossicità per la specie utilizzata (OECD, 2019). Il protocollo ISO suggerisce l'utilizzo del solo acetone per quanto riguarda i test con *A. tonsa*, contemplando un controllo negativo (solo acqua di diluizione) e uno negativo con acetone, avente la stessa concentrazione di solvente delle altre soluzioni test (ISO, 2015). In letteratura è riportata una soglia di concentrazione di 157 mg L⁻¹ di acetone oltre la quale sono stati registrati effetti dannosi sullo sviluppo larvale (Andersen et al., 1999). Nonostante nel presente lavoro di tesi la concentrazione di solvente è rimasta al di sotto della soglia di Andersen et al. (1999), si è scelto di aggiungere un controllo negativo con acetone in modo da escludere possibili effetti del solvente sulla produzione di uova e pellet fecali. Si è scelta la concentrazione di 7,3 mg L⁻¹, un valore maggiore rispetto alla massima concentrazione di acetone presente nelle soluzioni test (1,9 mg L⁻¹ e 2,3 mg L⁻¹ per EHS e OCT rispettivamente).

Le soluzioni test sono state preparate diluendo un'aliquota di soluzione madre con il medium di mantenimento della coltura, arricchito con il mix algale come alimento.

Sono state preparate 4 concentrazioni con un intervallo da 0,1-10 µL per entrambe le sostanze EHS e OCT, un controllo negativo con medium ISO 20‰ e un controllo con acetone. Le soluzioni test sono state verificate presso il laboratorio di chimica analitica dell'università Ca' Foscari di Venezia per stabilire la reale concentrazione di sostanza al tempo zero e ai successivi rinnovi parziali (ai giorni 3, 5 e 7). La concentrazione dell'analita è avvenuta per estrazione in fase solida per mezzo di cartucce (200 mg, 6 cm³) per poi essere analizzata con gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa tandem (GC-MS/MS). Le concentrazioni effettive di EHS e OCT sono riportate sotto e nelle tabelle del capitolo 3.1, numeri 3.1 e 3.2.

2.2.2 Procedura test

Un numero di circa 300 uova è stato inserito in bottiglie da 500 mL in vetro borosilicato. Sono state preparate un numero di 6 bottiglie totali, 4 bottiglie contenenti le soluzioni test: 0,06 µg L⁻¹; 0,37 µg L⁻¹; 2,23 µg L⁻¹; 7,46 µg L⁻¹ per EHS e 0,07 µg L⁻¹; 0,19 µg L⁻¹; 0,67 µg L⁻¹; 4,36 µg L⁻¹ per OCT. Nelle rimanenti sono stati inseriti i controlli (medium ISO e medium con acetone). In tutte le unità sperimentali è stato aggiunto mix algale come nutrimento, in quantitativo sufficiente perché non si

verificassero situazioni di malnutrizione che avrebbero concorso negativamente allo sviluppo e alla sopravvivenza degli organismi, provocando un'ulteriore situazione stressogena. Si è perciò mantenuta una densità algale di 6×10^4 cell/mL dei ceppi algali utilizzati per nutrire la coltura di laboratorio (*Tetraselmis suecica*, *Diacronema lutheri*, *Tisochrysis lutea*).

Le bottiglie sono state mantenute in condizioni semi-statiche per un periodo di per 10 giorni, tempo necessario al raggiungimento della maturità sessuale dei copepod, alla temperatura di 20 °C ambiente. Inserendo le bottiglie in un miscelatore rotativo (agitatore a rotazione VELP modello ROTAX 6.8) a 1 rpm è stato possibile indurre una leggera agitazione, per mantenere le alghe in sospensione e simulare l'ambiente tipico della colonna d'acqua.

Le soluzioni sono state rinnovate ai giorni 3, 5, 7, prelevando un'aliquota di 250 mL da ogni bottiglia. Si è scelto di non rinnovare giornalmente e di sifonare il fondo invece di travasare la quantità da sostituire, per ridurre al minimo lo stress del ricambio agli organismi, soprattutto per i primi stadi di sviluppo, i più sensibili. Gli organismi ritenuti dai setacci sono stati reinserti velocemente nella bottiglia. La soluzione filtrata è stata raccolta in bottiglie di vetro ambrate, precedentemente lavate con acetone, e poste in congelatore (-20°C) per l'analisi chimica. Per ogni replica sono stati misurati i parametri di OD e pH. Un volume corrispondente di 250 mL è stato sostituito come rinnovo parziale per ottenere un'esposizione il più possibile costante al contaminante testato. Essendo ogni soluzione preparata aggiungendo mix algale, gli organismi sono stati nutriti con cibo vivo per tutta la durata del test.

Dopo 10 giorni, si è filtrato il contenuto di ogni bottiglia, con l'accortezza di rimuovere tutti gli organismi con un setaccio da 170 µm, in modo analogo alla procedura di pulizia della coltura di mantenimento descritta in precedenza. I copepod sono stati immediatamente trasferiti all'interno di cristallizzatori da 200 mL con un quantitativo sufficiente di soluzione, per l'osservazione allo stereomicroscopio dello stadio di sviluppo e della salute dei copepod, in particolare è stata valutata la corretta motilità. Gli adulti sani presentano il tipico nuoto intermittente di molti copepod, caratterizzato da salto e affondamento ("*hop-sink*" *behaviour*), la maggior del tempo sono in affondamento passivo, per poi nuotare con scatti molto veloci (Buskey, 1994). Le femmine adulte con danni visibili, come antenne danneggiate e che, previa stimolazione gentile, non nuotavano sono state scartate.

Per mezzo dello stereomicroscopio, sono state selezionate 10 femmine, essendo visivamente più grandi (circa 0,2mm più grandi) e con le antenne perpendicolari al corpo. Per verificare fossero effettivamente femmine, sono state poste in una piastra a 24 pozzetti, già riempita con qualche mL di acqua marina ricostituita, e si sono osservate al microscopio.



Figura 2.2 - Tipo di vial utilizzata, contenente ciascun individuo femmina di *A. tonsa*

Si sono preparate quindi vials da 30 mL, con 25 mL di soluzione test (figura 3.4), alle stesse concentrazioni di filtro UV della prima parte dell'esperimento. Si è inserita una femmina in ogni vial, le quali sono state poi chiuse con tappo in dotazione e poste in camera termostatica ($T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperiodo 16:8 L/B) a condizioni statiche.

Dopo 24h, si è trasferita la femmina dalla vial del giorno 1° e si pone in altra vial (giorno 2°) con soluzione rinnovata. Per il trasferimento si è utilizzata una pasteur invertita, con la parte più larga il passaggio dell'individuo avviene senza venga danneggiato dalla pressione di aspirazione. Durante questa fase, è stato necessario prelevare esclusivamente il copepode, avendo cura di non risospendere il sedimento per evitare di trasferire

accidentalmente le uova e i pellet fecali nella provetta successiva. L'ausilio di un sistema di illuminazione a luce fredda con braccio flessibile ha permesso un più agevole prelievo dell'organismo, le cui dimensioni sono minuscole. Nella figura 2.3 vi è un ingrandimento della vial con l'*Acartia*, evidenziata dal cerchio in rosso. Per confronto, è stato inserito il diametro delle vial, sempre in rosso.

Il contenuto della vial svuotata è stato filtrato con un filtro con griglia (diametro 47mm, porosità 0,45 μm). La vial e il bicchiere filtrante vanno sciacquati con spruzzetta per raccogliere tutte le uova e pellet.

Il filtro è stato osservato allo stereomicroscopio per il conteggio di uova e pellet fecali prodotti ed è stato eseguito giornalmente, fino alla fine del test, che in questa seconda fase, ha avuto una durata totale di 4 giorni. I dati sono stati riportati come produzione di uova giornaliera per femmina al giorno (uova femmina⁻¹ g⁻¹) e la produzione di pellet fecali giornaliera per femmina al giorno (pellet femmina⁻¹ g⁻¹).

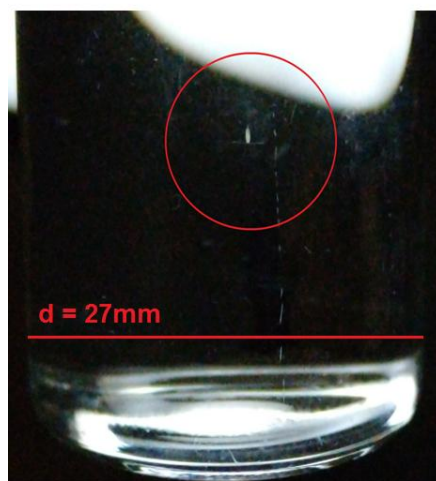


Figura 2.3 - Ingrandimento di una vial ($d=27\text{ mm}$) contenente il campione. Nel cerchio è evidenziata *A. tonsa*.

I pellet fecali si presentano di forma cilindrica di colore tendenzialmente marroncino. Nella figura 2.4 si possono distinguere i pellet (cerchiati in arancio), si può notare possiedono forma regolare, punto distintivo rispetto ad altre forme di detrito, solitamente agglomerati di alghe morte, da non considerare nel conteggio. Invece con l'indicatore in rosso è evidenziato un uovo deformato.

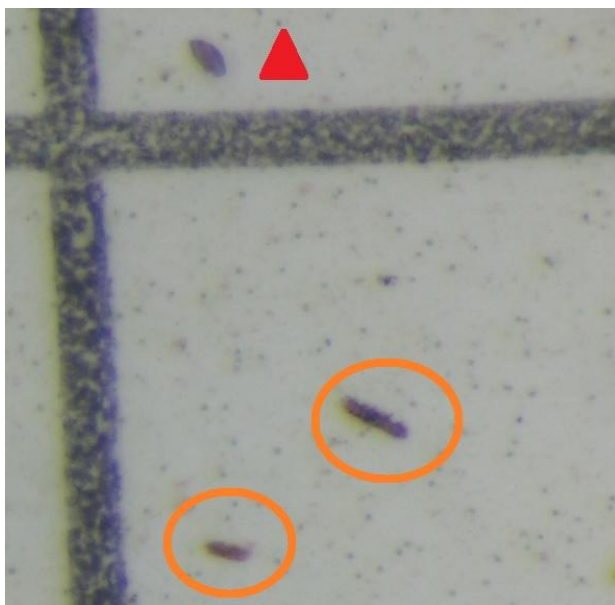


Figura 2.4 - Ingrandimento di un filtro a griglia di un campione in vial (test cronico). Cerchiato in arancione c'è un pellet fecale.

2.3 Analisi statistica

Per l'elaborazione dei dati sono stati utilizzati parametri di statistica descrittiva quali: media, mediana, varianza, deviazione standard ed errore standard.

I dati grezzi sono stati aggregati come media giornaliera per concentrazione e media per individuo nei quattro giorni di durata del test (dal giorno 11 al giorno 14). Sono stati presentati come medie errore standard (ES) e/o medie deviazione standard (DS).

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il test parametrico univariato ANOVA, previa verifica delle condizioni esecuzione. Per la condizione di normalità è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk ($0 < W < 1$; $p > 0,05$) mentre per l'omoschedasticità dei dati è stato utilizzato il test di Levene ($p > 0,05$). Nel caso in cui una delle due condizioni non fosse risultata soddisfatta, si è utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis. Nel caso in cui il test ANOVA a una via avesse evidenziato una differenza significativa ($p > 0,05$), si è proceduto con il test *post-Hoc* di Tukey i gruppi fra loro statisticamente differenti. Nel caso in cui si fosse utilizzato il test di Kruskal-Wallis, il test *post-Hoc* accoppiato è stato quello di Mann-Whitney.

I dati sono stati elaborati con il software statistico Jamovi (versione 2.6.44 solid).

Per l'illustrazione dei dati sono stati usati grafici a barre, boxplot e ridgeline plot (joyplot). In particolare, il ridgeline plot è stato utilizzato per confrontare la distribuzione dei dati nei diversi trattamenti, grazie alle stime di densità, ha permesso una visualizzazione in termini di tendenza per la durata del test (Wilke C., 2019).

3. RISULTATI

3.1 Analisi chimiche

Le soluzioni test prelevate al giorno zero, 3, 5, 7 e 10, sono state analizzate per stabilire la concentrazione di OCT e EHS presente in soluzione. Nella tabella 3.1 sono elencate le concentrazioni effettive di etilesil-salicilato rilevate con GC-MS/MS.

Concentrazioni effettive EHS ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
Giorno 0	Giorno 3	Giorno 5	Giorno 7	Giorno 10
0,06	0,04	0,07	0,05	0,02
0,37	0,05	0,03	0,02	0,02
2,23	0,25	0,09	0,07	0,02
7,46	3,84	0,93	1,12	0,32

Tabella 3.1 - Concentrazioni di EHS misurate nelle soluzioni test con metodo analitico GC-MS/MS.

Come si può notare dalla tabella 4.1, si è osservata una forte diminuzione della concentrazione di EHS nella durata dell'esperimento, nonostante il periodico ricambio della soluzione test. Il decremento risulta particolarmente evidente considerando le concentrazioni più alte ($2,23 \mu\text{g L}^{-1}$ $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$), nelle quali meno del 5% dell'analita è rimasto in soluzione alla fine del decimo giorno. In base a considerazioni biologiche, si scelto di riferire i risultati di tossicità rispetto ai valori delle concentrazioni iniziali, nonostante il forte decremento della sostanza nelle soluzioni. Essendo gli stadi lavalari i più sensibili all'effetto tossico dei contaminanti (ISO, 2015), gli eventuali effetti avversi riscontrati negli adulti sviluppatasi nella soluzione test, sono largamente attribuibili al picco di concentrazione al quale i naupli sono stati esposti, vale a dire alle concentrazioni del giorno zero e le ore immediatamente successive.

In tale contesto non c'è rischio di sovrastimare la tossicità di EHS ma è plausibile che venga invece sottostimata. Anche se *A. tonsa* è stata esposta a concentrazioni minori di EHS nei giorni successivi al tempo zero, gli effetti avversi sono risultati persistenti (il test infatti ha una durata di 10 giorni per la prima fase e di 4 per la seconda) e si sono manifestati anche in condizioni di contaminante molto inferiori a quelle iniziali (soprattutto negli ultimi giorni della prima fase di esposizione).

Per l'octocrilene, le concentrazioni (tabella 4.2) sono rimaste più stabili, in un range fra 80-120% rispetto a quelle iniziali in linea con quanto atteso sulla base della persistenza del prodotto. I valori misurati di questo filtro UV nelle soluzioni rispecchiano le concentrazioni riscontrabili nelle acque costiere (Cadena-Aizaga, 2022).

Concentrazioni effettive OCT ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
Giorno 0	Giorno 3	Giorno 5	Giorno 7	Giorno 10
0,07	0,06	0,10	0,07	0,09
0,19	0,11	0,12	0,10	0,22
0,67	0,63	0,65	0,65	0,57
4,36	2,20	5,16	8,30	5,71

Tabella 3.2 - Concentrazioni di OCT misurate analiticamente con GC-MS/MS.

3.2 Test di tossicità - generalità

La produzione di uova è stata utilizzata come proxy di effetto sulla riproduzione, mentre quella di pellet fecali è stata usata per l'effetto sull'alimentazione. Per la valutazione della produttività sono state impiegate la media aggregata giornaliera per trattamento e la media di produzione per ciascun individuo per la durata del test (giorni 11-14). I dati sono stati espressi come uova prodotte per femmina al giorno (uova femmina⁻¹ al giorno⁻¹) e come pellet prodotti per femmina al giorno (pellet femmina⁻¹ al giorno⁻¹). Ad ogni media è stato associato l'errore standard (ES) o la deviazione standard(DS) a seconda del caso.

3.2.1 Confronto fra controllo e acetone

Per escludere effetti tossici dovuti all'acetone usato come solvente nelle soluzioni madre, il controllo e il controllo con acetone sono stati valutati dal punto di vista statistico. Nella figura 3.1 è illustrato il grafico a colonne con la produzione di uova nel controllo e nell'acetone, si può notare che le medie dei valori siano fra loro comparabili, il controllo presenta una media di $22,3 \pm 5,23$ (ES) mentre il controllo con acetone ha una media di $17,6 \pm 5,74$ (ES). La verifica delle ipotesi di normalità e omoschedasticità è risultata rispettata (Shapiro-Wilk: $W = 0,903$, $p = 0,236$; Levene, $p = 0,577$) e il test ANOVA a una via non ha evidenziato differenze significative fra i due tipi di controllo nella produzione di uova ($p = 0,536$). Nella figura 3.2 è raffigurata la produzione di pellet nel controllo e nel controllo con acetone. Anche in questo caso come si può notare dalla figura le medie di produzione risultano con differenze minime, con una media nel controllo pari a $97,3 \pm 16,8$ (ES) e quella nel controllo con acetone a $95,5 \pm 18,9$ (ES). Anche in questo caso il test con ANOVA a una via non ha identificato differenze significative fra i due controlli (Shapiro-Wilk: $W = 0,856$, $p = 0,067$; Levene: $p = 0,606$; ANOVA: $p = 0,946$).

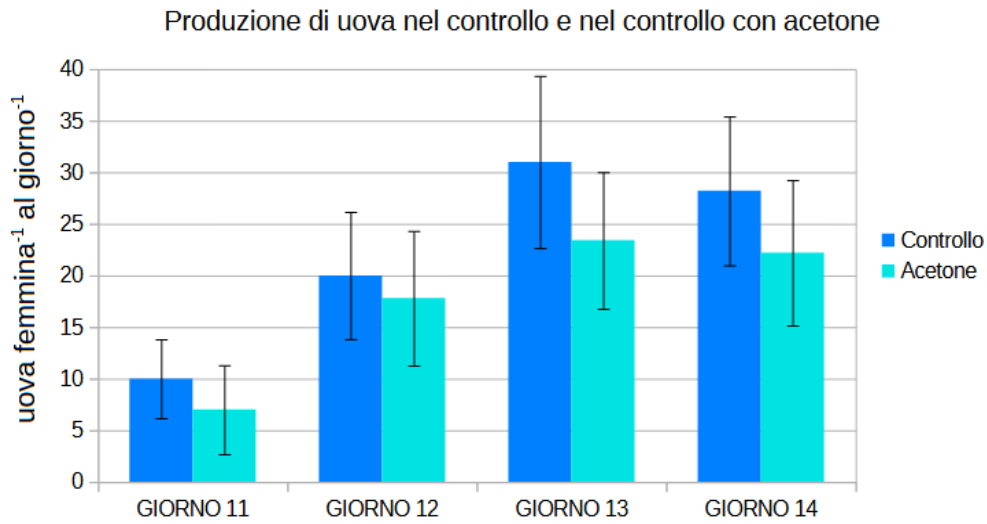


Figura 3.1 - Produzione di uova nel controllo e controllo con acetone espressi come media giornaliera. Le barre d'errore rappresentano l'errore standard.

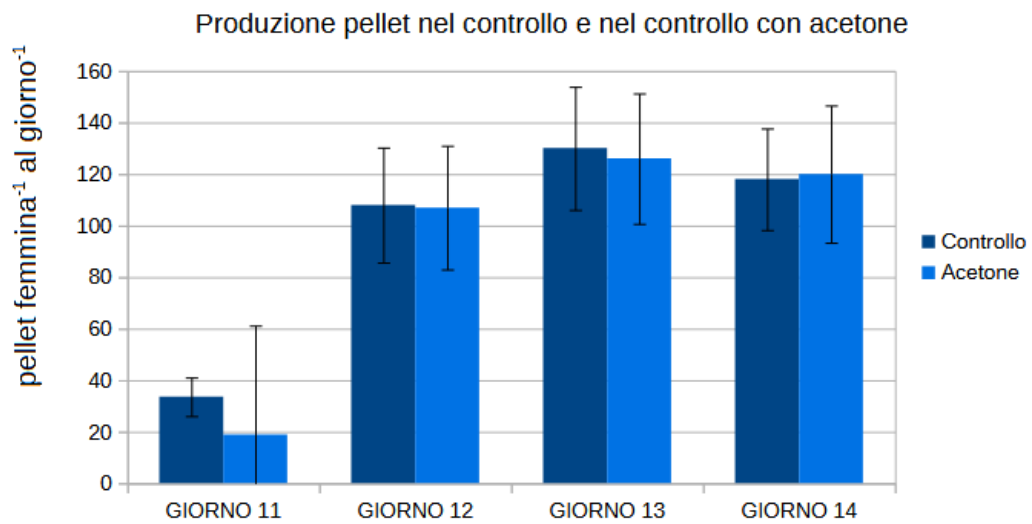


Figura 3.2 - Produzione di pellet nel controllo e controllo con acetone. Media giornaliera. Le barre d'errore rappresentano l'errore standard.

3.3 Test di tossicità – Etilsil-salicytalo (EHS)

3.3.1 Produzione di uova

La produzione di uova giornaliera è illustrata nella figura 3.3. Come si può notare, il giorno 11 il maggior quantitativo di uova è stato registrato per la concentrazione $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$, con una media di uova pari a $21,5 \pm 5,3(\text{ES})$, mentre il minore numero di uova è stato osservato nella concentrazione maggiore $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$, con $2,88 \pm 2,45(\text{ES})$. Dall'analisi statistica non risultano differenze significative fra i trattamenti del primo giorno secondo il test di Kruskal-Wallis, utilizzato in quanto non erano soddisfatte le premesse di omoschedasticità (Shapiro-Wilk: $W = 0,966$, $p = 0,267$; Levene: $p = 0,007$; Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 8,129$, $p = 0,0823$).

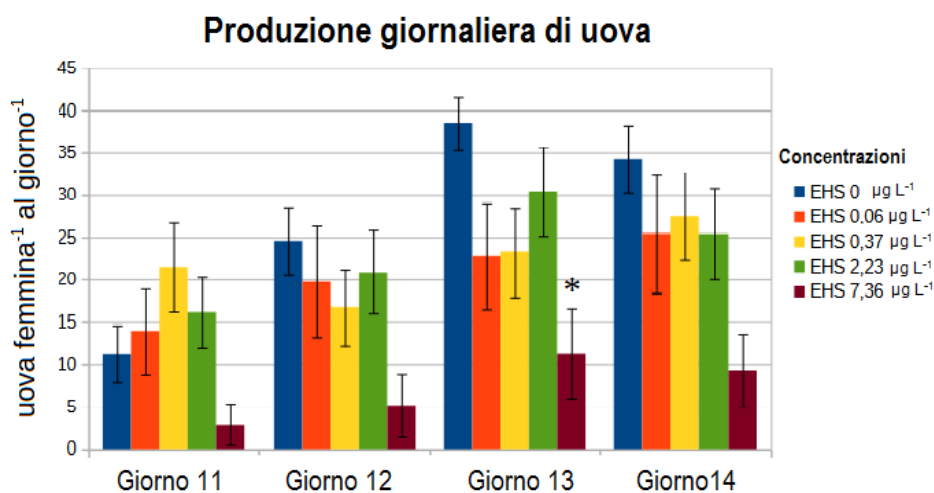


Figura 3.3 - Produzione giornaliera di uova. L'asterisco indica differenza significativa fra il controllo e la concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$. In blu è indicato il controllo. Le barre d'errore sono espresse come errore standard.

Al giorno 12 la produzione di uova nel controllo ha registrato un incremento, passando da un valore di $11,2 \pm 3,44(\text{ES})$ a una media di $24,60 \pm 3,93(\text{ES})$, con un quantitativo superiore rispetto a tutte le altre concentrazioni. Dal giorno 12 fino alla fine del test, la produzione maggiore di uova rimane quella del controllo, con un trend di crescita fino al 13° giorno, in cui c'è stato il picco di produzione ($38,4 \pm 3,09(\text{ES})$) per poi diminuire leggermente al giorno 14 ($34,2 \pm 3,93(\text{ES})$).

Per quanto riguarda gli altri trattamenti, la concentrazione $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ presenta un trend di crescita per tutta la durata del test (giorno 11-14) con un minimo di $13,86 \pm 5,05(\text{ES})$ e un massimo di $25,43 \pm 6,99(\text{ES})$. Il trattamento a $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$, dopo il picco del primo giorno, presenta un trend altalenante con un minimo di uova prodotte il giorno 12 ($16,7 \pm 4,53(\text{ES})$) e un massimo prodotto il giorno 14 ($27,5 \pm 5,24(\text{ES})$). La concentrazione $2,23 \mu\text{g L}^{-1}$ presenta invece un minimo di $16,1 \pm 4,11(\text{ES})$ al giorno 11 e un massimo di $30,4 \pm 5,25(\text{ES})$ al giorno 13.

La minima quantità di uova prodotte giornalmente si è misurata alla concentrazione di $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$, con una media minima di uova $2,88 \pm 2,45(\text{ES})$ il primo giorno fino a un massimo di $11,25 \pm 5,29(\text{ES})$ misurato il terzo giorno, mantenendosi a un livello di produttività inferiore a tutti gli altri trattamenti per l'intera durata del test.

Dall'elaborazione statistica non sono emerse differenze significative fra la produzione di uova giornaliera nei giorni 11, 12 e 14 fra i trattamenti e il controllo. Al giorno 13 i test statistici hanno evidenziato una differenza significativa tra la produzione di uova nel controllo e quella nella concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$, come è evidenziato dalla figura 3.3. Nell'analisi statistica entrambe le condizioni di normalità e omoschedasticità delle varianze sono risultate soddisfatte (Shapiro-Wilk, $W = 0,986$, $p = 0,887$; Levene, $p = 0,260$) è stato quindi eseguito il test ANOVA a una via ($p = 0,037$) e a seguire il test *post-Hoc* di Tukey che ha rilevato una differenza significativa fra il controllo e la concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$ ($p = 0,031$).

Per quanto riguarda la produzione media dal giorno 11-14, si può notare come la quantità rilevata nel controllo sia superiore al resto dei trattamenti esaminati (figura 3.4), con una media di $27,3 \pm 1,23(\text{ES})$. Il maggior quantitativo di uova misurato è stato 48 uova, al giorno 13, il numero minore è stato 3 uova al giorno 11, i valori di produzione in questo caso sono dello stesso individuo nel gruppo di controllo.

La produzione di uova nella concentrazione $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ è stata con minimo di 0 uova e un massimo di 52 uova nell'arco dei 4 giorni di test, per la concentrazione $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ il minimo è stato di 0 uova nelle giornate 11 e 12 e il massimo è stato 50 uova al giorno 13, mentre nella concentrazione $2,23$ il minimo è stato di 0 il primo giorno e il massimo è stato 52 il terzo giorno.

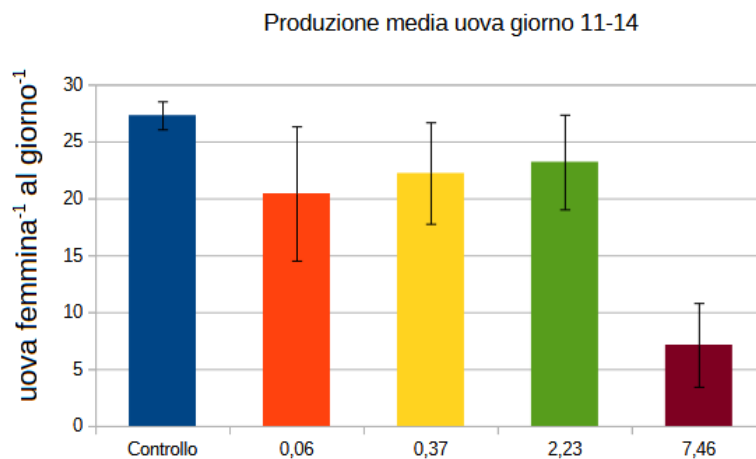


Figura 3.4 - Produzione medi di uova dal giorno 11 al giorno 14. Le concentrazioni in ascisse sono espresse in $\mu\text{g L}^{-1}$. Barre d'errore espresse come errore standard.

La variabilità dei dati della produzione media di uova è illustrata nel boxplot della figura 3.5, in cui è rappresentata la mediana (barra nera), mentre i limiti inferiore e superiore del box sono rappresentati dal primo e terzo quartile. I whiskers del grafico indicano i valori minimo e massimo per ogni concentrazione media nei giorni 11-14. Si può notare la bassa variabilità del controllo (valore media min = 24,8; max = 31,5) rispetto agli altri trattamenti.

La concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$ ha presentato un numero minimo di uova prodotte nell'arco dei 4 giorni, con individui che hanno prodotto in alcune giornate un numero di uova pari a 0, in generale, il gruppo della concentrazione si è rivelato con maggioranza di femmine poco produttive che hanno deposto uova in un intervallo da 0-3 durante i 4 giorni di esposizione. Fa eccezione una replica, che è stata evidenziata con il numero 35 nel boxplot in figura 3.5, che ha presentato una produzione di uova molto elevata rispetto al resto degli individui, con un numero minimo di uova prodotte al giorno 11 pari a 20 uova e un numero massimo di 44 uova il giorno 13.

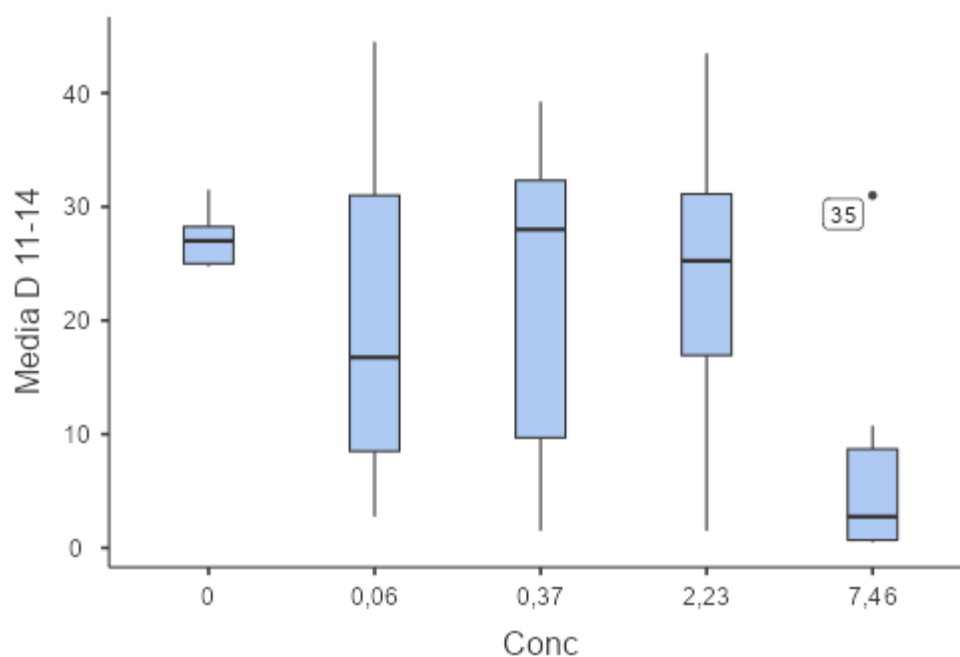


Figura 3.5 - Boxplot della produzione di uova media dal giorno 11 al giorno 14 (ascissa) per ogni concentrazione in $\mu\text{g L}^{-1}$ (ordinata). La barra orizzontale di ogni box indica la mediana (50° percentile), i limiti inferiore e superiore della scatola rappresentano rispettivamente il primo quartile (25° percentile) e il terzo quartile (75° percentile). I whiskers indicano il valore minimo e massimo di ciascuna concentrazione. Il riquadro con 35 sta ad indicare la replica nella concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$ con una produzione di uova paragonabile al controllo.

Sono stati eseguiti test statistici sulle medie di produzione dei 4 giorni di esposizione. I requisiti per il test ANOVA a una via sono risultati soddisfatti (Shapiro-Wilk: $W = 0,976$, $p = 0,531$; Levene: $p = 0,066$) con però un valore basso per il test di Levene. L'ANOVA a una via ha riscontrato una differenza significativa con però un risultato borderline ($p = 0,045$). Il test *post-Hoc* di Tukey però

non ha evidenziato differenza significativa fra il controllo e la concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$ ($p = 0,060$). In considerazione dell'elevata variabilità dei dati (figura 3.5) e del conflitto di significatività statistica fra risultato del test omnibus (ANOVA) e *post-Hoc* Tukey, si è scelto di utilizzare Krustal-Wallis, che non ha riscontrato differenze significative fra i trattamenti ($\chi^2 = 8,703$, $p = 0,0688$).

Il controllo presenta la minore variabilità nelle misurazioni, come si può notare nella figura 3.5 con valori di DS pari a 2,76. Mentre i trattamenti $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$, $2,23 \mu\text{g L}^{-1}$ presentano la maggiore variabilità con medie e DS rispettivamente di $20,43 \pm 15,6$, $22,23 \pm 14,1$ e $23,20 \pm 13,2$. Anche la concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$ presenta abbastanza variabilità con media di $7,13 \pm 10,4$.

Nella figura 3.6, c'è il ridgeline plot (joyplot). in cui si può visualizzare la distribuzione della produzione di uova. La curva del controllo è in azzurro, presenta un picco ben definito e centrale, a campana, ciò sta a significare una produzione di uova più costante. I trattamenti centrali mostrano curve appiattite, indicando la maggior variabilità fra i dati. Nella concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$ si può osservare come le uova prodotte siano maggiormente nell'intervallo 0-10 uova (uova femmina⁻¹ al giorno⁻¹).

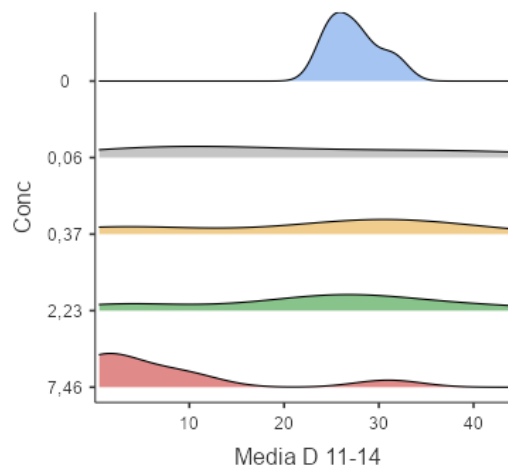


Figura 3.6 - Grafico di densità di Joy per controllo e trattamenti della produzione di uova. In ascissa c'è la produzione di uova media dal giorno 11 al giorno 14 espressa come uova femmina⁻¹ al giorno⁻¹, in ordinata vi sono i trattamenti espressi come $\mu\text{g L}^{-1}$. In azzurro è segnalato il controllo.

3.3.2 Produzione di pellet fecali

Osservando la figura 3.7, si può vedere come la produzione di pellet abbia un trend di crescita per tutti i trattamenti per la durata del test.

La misura più bassa di pellet è stata riscontrata nel controllo al giorno 11 con un quantitativo di 14 pellet, mentre il quantitativo maggiore è stato misurato nelle concentrazioni 0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,23 $\mu\text{g L}^{-1}$ pari a 216 pellet per entrambi i trattamenti il giorno 13.

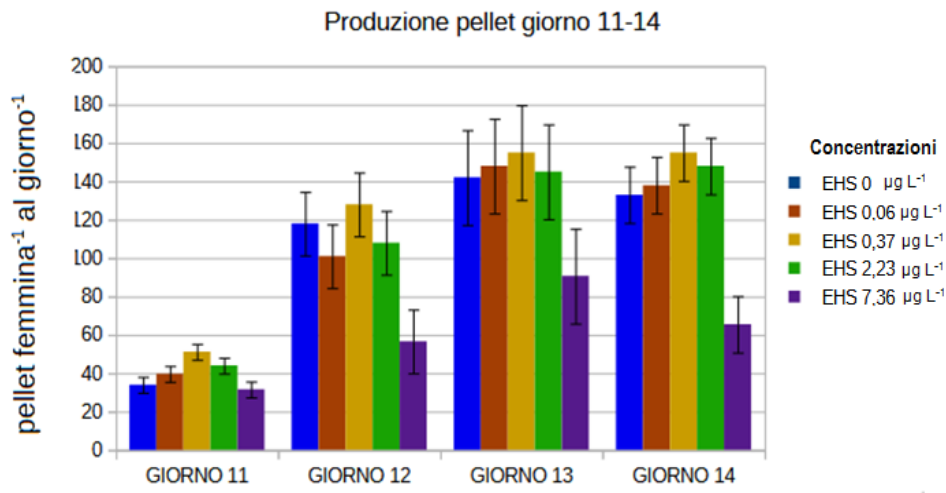


Figura 3.7 - Produzione giornaliera di pellet. In blu è indicato il controllo. Le barre d'errore sono espresse come errore standard.

Nel giorno 11 la variabilità fra le concentrazioni è stata più contenuta, con medie che vanno da un valore minimo di $31,6 \pm 4,14(\text{ES})$ nella concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$ e un massimo di $51,2 \pm 4,16(\text{ES})$ nella concentrazione $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$.

A partire dal giorno 12 vi è un aumento della produzione di pellet, con medie che superano il centinaio nel controllo e nei trattamenti $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ e $2,23 \mu\text{g L}^{-1}$. La concentrazione $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$ risulta invece avere medie decisamente inferiori con valore massimo di $90,6 \pm 24,7(\text{ES})$ nel giorno 13.

La maggiore produzione giornaliera di pellet si è riscontrata nella concentrazione $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ per tutta la durata del test con quantitativi superiori al controllo, con una media minima di $51,2 \pm 4,16(\text{ES})$ il giorno 11 e una massima il giorno 13 e 14, pari a $155 \pm 14,5(\text{ES})$ e $155 \pm 18,8(\text{ES})$ rispettivamente.

Le condizioni di normalità e omoschedasticità dei dati è risultata rispettata in tutti i gruppi, perciò è stato possibile applicare il test ANOVA una via e il successivo test *post-Hoc* di Tukey nel caso di ipotesi alternativa accettata. Dai test statistici sono emerse differenze significative fra trattamenti ma non fra trattamenti e controllo. In particolare, risultano statisticamente differenti la produzione di pellet nel giorno 11 fra le concentrazioni $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ e $7,46 \mu\text{g L}^{-1}$ (Shapiro-Wilk: $W = 0,989$, $p = 0,952$; Levene: $p = 0,834$; ANOVA: $p = 0,018$; Tukey, $p = 0,015$) e nel giorno 14 fra $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ e

7,46 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tukey, $p = 0,014$) e 2,23 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 7,46 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tukey, $p = 0,029$). Nel giorno 14, pur essendo rispettate le condizioni di omoschedasticità dei dati (Levene, $p = 0,166$), il test di normalità ha restituito un valore borderline (Shapiro-Wilk, $W = 0,947$, $p = 0,059$).

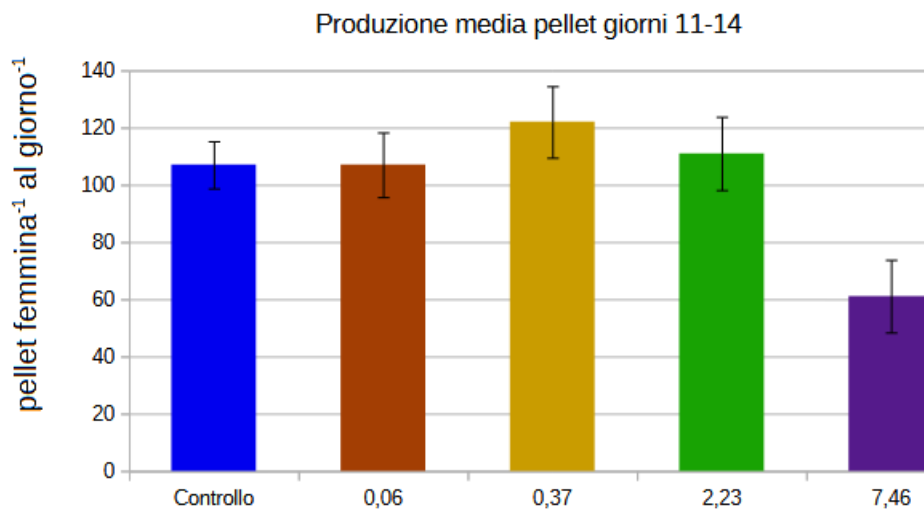


Figura 3.8 - Produzione medi di pellet dal giorno 11 al giorno 14. Le concentrazioni in ascisse sono espresse in $\mu\text{g L}^{-1}$. Barre d'errore espresse come errore standard.

La produzione media di pellet nei 4 giorni di durata del test è simile nel controllo e nelle concentrazioni 0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,23 $\mu\text{g L}^{-1}$, mentre, come si può osservare da figura 3.8, nella concentrazione maggiore (7,46 $\mu\text{g L}^{-1}$) la media dei 4 giorni è molto più bassa, con un valore di $61,1 \pm 12,7$ (ES).

La figura 3.9 mostra il boxplot della produzione di pellet media nei giorni 11-14. I whiskers Analogamente alla produzione di uova, la variabilità dei pellet nel controllo risulta essere inferiore nei 4 giorni di esposizione rispetto agli altri trattamenti, come è evidenziato dalla figura 3.8. La maggiore variabilità si riscontra nelle concentrazioni 0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,23 $\mu\text{g L}^{-1}$, con valori medi nei 4 giorni di pellet pari a $122 \pm 39,4$ (DS) e $111 \pm 40,5$ (DS) rispettivamente, mentre la minore variabilità è presente nel controllo il cui valore medio di produzione nei giorni 11-14 è di $107 \pm 18,4$ (DS).

Nella figura 3.10 è illustrato il grafico della densità dei valori. I trattamenti centrali (0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,23 $\mu\text{g L}^{-1}$) presentano un appiattimento generale, coprendo un ampio intervallo in numero di pellet prodotti. Per la concentrazione 7,46 $\mu\text{g L}^{-1}$ la curva è spostata a sinistra indicando una produzione inferiore come quantitativo di pellet rispetto alle concentrazioni.

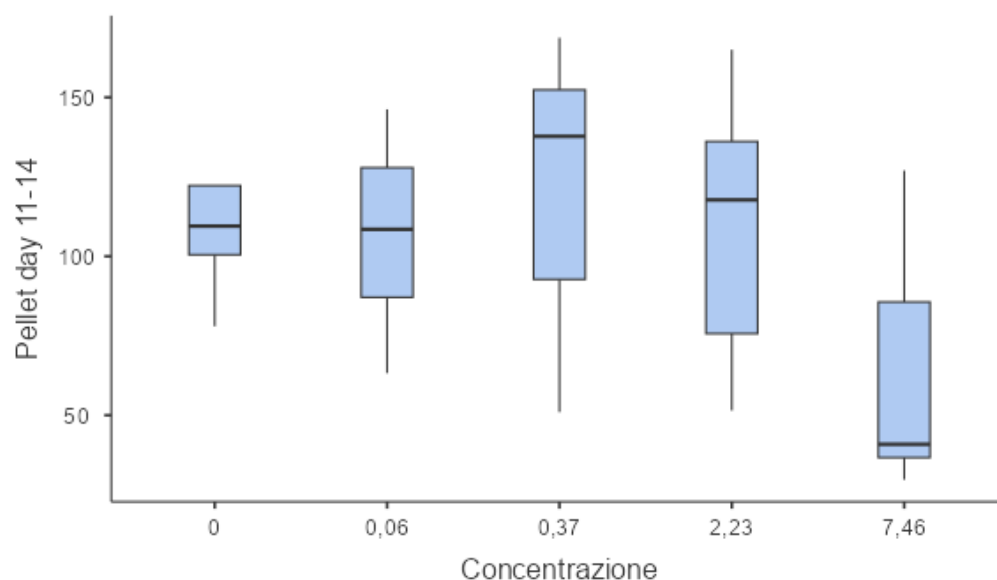


Figura 3.9 - Boxplot della produzione di pellet media dal giorno 11 al giorno 14. Le concentrazioni in ascissa sono espresse come $\mu\text{g L}^{-1}$. I whiskers indicano il valore minimo e massimo di ciascuna concentrazione. La barra orizzontale di ogni box indica la mediana (50° percentile), i limiti inferiore e superiore della scatola rappresentano rispettivamente il primo quartile (25° percentile) e il terzo quartile (75° percentile).

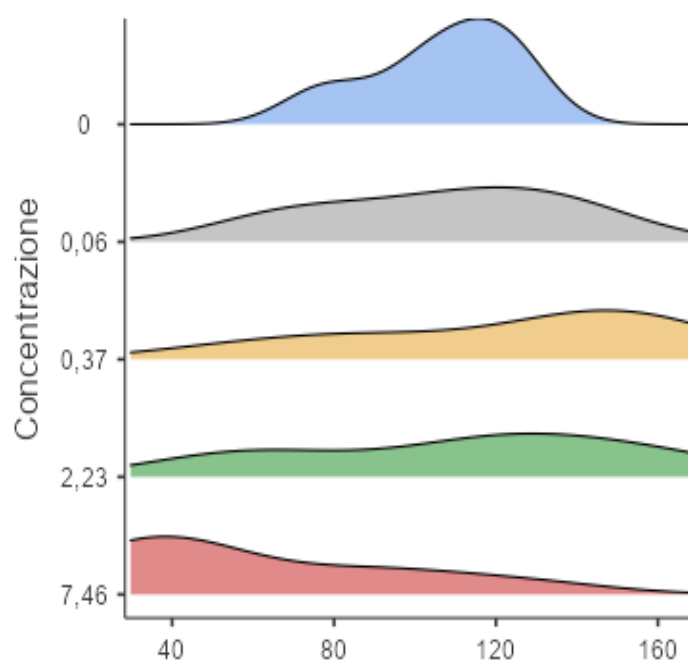


Figura 3.10 - Grafico di densità di Joy per controllo e trattamenti. In ascissa c'è la produzione di pellet media dal giorno 11 al giorno 14 espressa come pellet femmina⁻¹ al giorno⁻¹, in ordinata vi sono i trattamenti espressi come $\mu\text{g L}^{-1}$. In azzurro è segnalato il controllo.

3.3.3 Correlazione uova-pellet

Infine, è stata eseguita l'analisi di correlazione di Spearman, che ha riscontrato una correlazione positiva e significativa fra il numero di uova e il numero di pellet ($\rho = 0,843$, $p < 0,001$). Come si può notare in figura 3.11 il numero di uova aumenta all'aumentare della quantità di pellet prodotti.

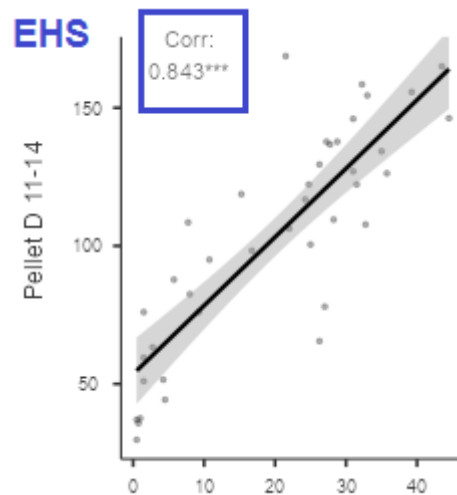


Figura 3.11 - Correlazione positiva fra il numero di uova e pellet ($\rho = 0.843$, $p < 0.001$) nei quattro giorni di osservazione per EHS.

3.4 Test di tossicità – Octocrilene (OCT)

3.4.1 Produzione di uova

Nella figura 3.12 si può osservare la produzione di uova giornaliera per la sostanza OCT. Il primo giorno non risultano sostanziali differenze fra il controllo, con media di $5,8 \pm 4,1$ (ES), e i trattamenti $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,67 \mu\text{g L}^{-1}$, con medie di $6,25 \pm 2,59$ (ES) e $7 \pm 2,79$ (ES), rispettivamente. I valori più bassi si sono riscontrati nei trattamenti $0,19 \mu\text{g L}^{-1}$, con un numero di uova prodotte tra 0 e 4, e $4,36 \mu\text{g L}^{-1}$, nel cui gruppo solo una femmina su sei ha deposto uova, per un totale di 12.

Il secondo giorno si può notare come quasi tutti i trattamenti abbiano presentato un forte aumento di produzione di uova rispetto al primo giorno, mentre la concentrazione maggiore ($4,36 \mu\text{g L}^{-1}$) mantiene una produzione piuttosto bassa, paragonabile al primo giorno, con media $2,17 \pm 1,64$ (ES). Il maggior quantitativo di uova è stato misurato nella concentrazione $0,67 \mu\text{g L}^{-1}$ con una media di $18 \pm 4,35$ (ES), valore che corrisponde a un picco di produttività mentre nei giorni successivi i valori si assestano attorno $14,4 \pm 3,13$ (ES) e $13,9 \pm 3,76$ (ES).

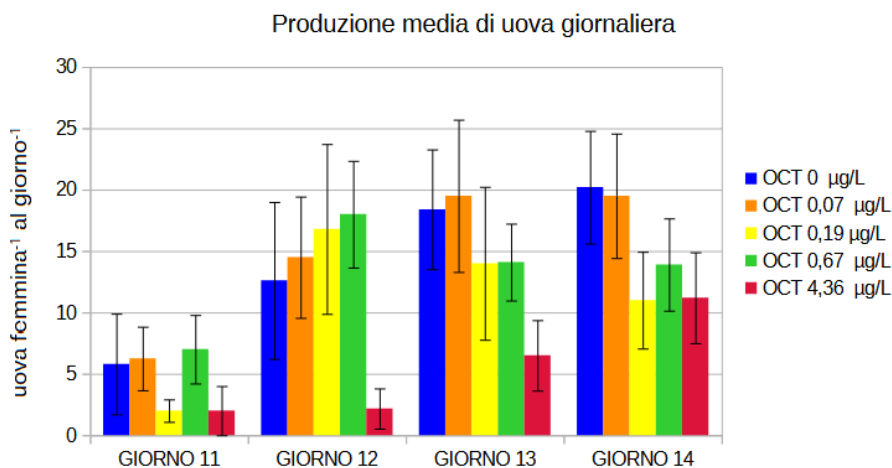


Figura 3.12 - Produzione di uova nel controllo con OCT. Media giornaliera.

Controllo e concentrazione $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ mantengono medie simili nei 4 giorni di esposizione. Il controllo presenta un incremento per tutta la durata del test mentre il trattamento presenta la stessa media per i giorni 13 e 14 i cui valori sono i seguenti: $19,5 \pm 6,2$ (ES) $19,5 \pm 5,07$ (ES).

Il trattamento con la concentrazione maggiore di OCT ($4,36 \mu\text{g L}^{-1}$) risulta avere il numero di uova prodotte minore rispetto a tutti gli altri trattamenti per tutta la durata del test. Il giorno 13 vi è un aumento di produzione, con media di $6,5 \pm 2,87$ (ES), ma la media più alta di uova prodotte si riscontra al giorno 14, con $11,2 \pm 3,7$ (ES). Nell'arco dei 4 giorni di test, solo una femmina ha avuto una produzione di uova costante, senza però mostrare il tipico aumento già riscontrato nei controlli e negli altri trattamenti, mentendosi con un quantitativo di uova deposte da 10-12. Nel resto del

gruppo alcune non hanno deposto uova nei giorni 11-12, altre hanno iniziato ad essere produttive solo dal terzo giorno.

Il test non parametrico di Kruskal-Wallis non ha evidenziato differenze significative fra il controllo e i trattamenti nel giorno 11 (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 3,78$, $p = 0,437$) e 13 (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 6,38$, $p = 0,173$). Il test di Kruskal-Wallis è stato applicato anche nei giorni 12 (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 6,62$, $p = 0,157$) e 14 (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 4,80$, $p = 0,308$), non rivelando differenza significative fra i gruppi.

Come riscontrato nella media giornaliera, anche nella produzione media dei giorni 11-14 la produzione minore di uova si ha per la concentrazione $4,36 \mu\text{g L}^{-1}$. L'ANOVA a una via non rileva però differenze significative tra la concentrazione maggiore e gli altri trattamenti (ANOVA, $p = 0,286$).

La variabilità dei dati della produzione media di uova per OCT è illustrata nel boxplot della figura 3.13. La mediana è rappresentata dalla barra nera, i limiti del box sono primo e terzo quartile. I whiskers del grafico indicano i valori minimo e massimo per ogni concentrazione media nei giorni 11-14.

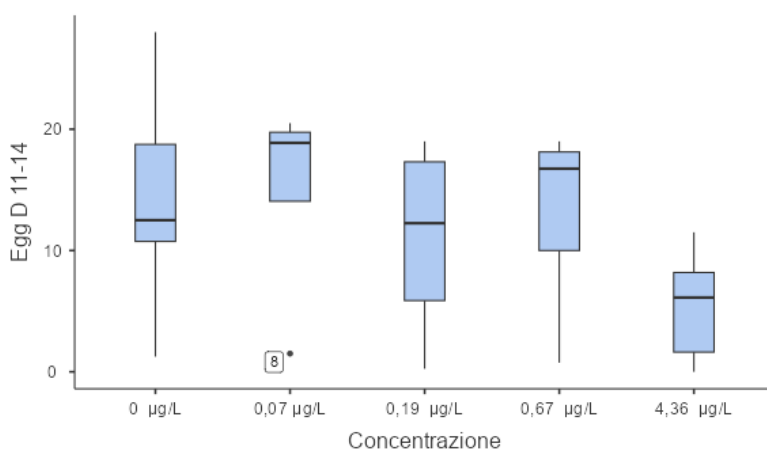


Figura 3.13 - Boxplot della produzione di uova media dal giorno 11 al giorno 14 (ascissa) per ogni concentrazione in $\mu\text{g L}^{-1}$ (ordinata). La barra orizzontale di ogni box indica la mediana (50° percentile), i limiti inferiore e superiore della scatola rappresentano primo e terzo percentile. I whiskers corrispondono ai valori minimi e massimi per ciascun trattamento. Nel riquadro 8 è evidenziato un valore particolarmente basso della concentrazione $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$.

Osservando la figura 3.13, si possono notare ampi segmenti di dispersione, ciò significa grande variabilità nei dati, in particolare. Le deviazioni standard calcolate risultano significativamente elevate (prossime o superiori al 50% della media), evidenziando una forte eterogeneità.

Il ridgeline plot (joyplot) conferma visivamente quanto rilevato nel grafico precedente. Nella figura 3.14 si può notare che il controllo e il trattamento $0,19 \mu\text{g L}^{-1}$ presentano la maggiore variabilità, con curve appiattite senza picchi (azzurro e in marroncino). Le concentrazioni $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,67 \mu\text{g L}^{-1}$ risultano avere un gruppo principale in cui si trova la maggior parte dei dati, ma avendo repliche con produzione più bassa, appaiono rigonfiamenti della curva a sinistra, rendendo la distribuzione disomogenea. Infine, la concentrazione in rosso, $4,36 \mu\text{g L}^{-1}$, mostra come il quantitativo di uova prodotte sia tendenzialmente su valori bassi, con la curva spostata verso sinistra.

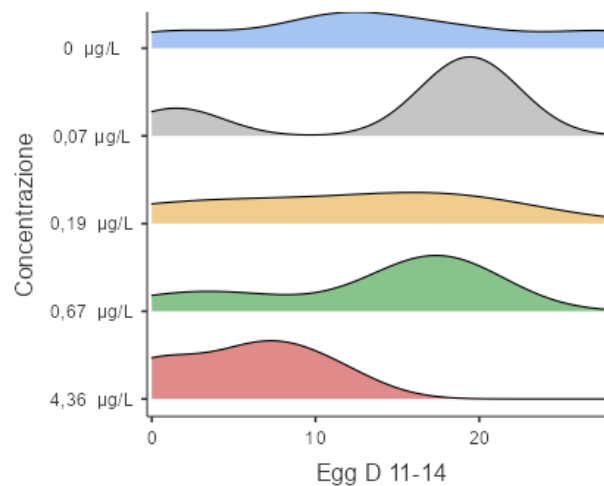


Figura 3.14 - Grafico di densità di Joy per controllo e trattamenti. In ascissa c'è la produzione di uova media dal giorno 11 al giorno 14 espressa come uova femmina⁻¹ al giorno⁻¹, in ordinata vi sono i trattamenti espressi come $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.4.2 Produzione di pellet fecali OCT

Dalla figura 3.15 si può vedere come il giorno 11 i trattamenti $0,19 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,67 \mu\text{g L}^{-1}$ presentino la maggiore produzione di pellet, con medie di $69,5 \pm 15,1(\text{ES})$ e $68,1 \pm 13,8(\text{ES})$ rispettivamente, mentre il controllo ha una media inferiore pari a $47,6 \pm 8,7(\text{ES})$. La produzione più bassa risulta essere quella della concentrazione $4,36 \mu\text{g L}^{-1}$ con una media di $33,8 \pm 9,77(\text{ES})$. Durante i test, alcuni trattamenti hanno confermato un trend di crescita dei pellet prodotti; per altri, invece, i risultati sono meno omogenei. La concentrazione $4,36 \mu\text{g L}^{-1}$ presenta un trend crescente, con un incremento più spinto tra giorno 13 e 14, con il raddoppio della produzione di pellet, si passa infatti da una media di $73,38 \pm 11,9$ nel giorno 13 a $158 \pm 16,7(\text{ES})$ il giorno 14.

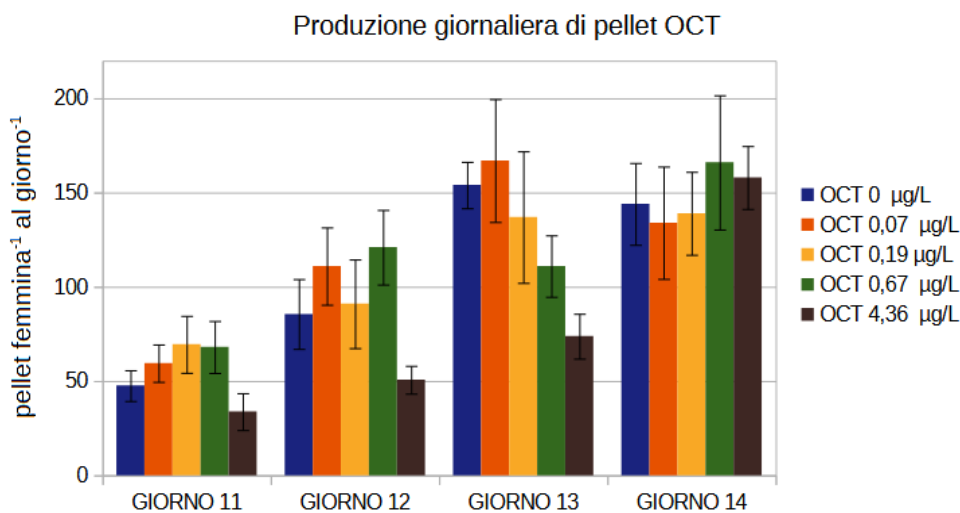


Figura 3.15 - Produzione giornaliera di pellet. In blu è indicato il controllo. Le barre d'errore sono espresse come errore standard.

Il controllo e la concentrazione $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ presentano un incremento continuo fino al giorno 13, giorno di picco di produzione con medie di $154 \pm 12,3(\text{ES})$ e $167 \pm 32,6(\text{ES})$ rispettivamente, per poi avere una diminuzione al giorno 14. Infine, il trattamento $0,67 \mu\text{g L}^{-1}$ si presenta con un trend altalenante, quasi raddoppia nel giorno 12 ($121 \pm 19,8(\text{ES})$), diminuisce leggermente il giorno 13 mentre il giorno 14 risulta avere la più alta produzione di pellet con $166 \pm 35,6(\text{ES})$.

Per quanto riguarda la produzione dei pellet fecali giornaliera, la distribuzione dei dati è risultata normale in tutte le giornate del test, anche l'ipotesi di omogeneità delle varianze è stata soddisfatta, è stato perciò possibile applicare il test ANOVA a una via per determinare eventuali differenze statistiche fra trattamenti. Dalle elaborazioni statistiche non sono emerse differenze significative fra i trattamenti nei giorni 11, 12 e 14 (ANOVA: $p_{11}=0,197$; $p_{12}=0,072$; $p_{14}=0,914$). Risulta invece una differenza significativa nel giorno 13 (ANOVA: $p_{13}=0,033$). Si è proceduto quindi col in test *post-Hoc* di Tukey che ha riscontrato una differenza fra la concentrazione $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ e $4,36 \mu\text{g L}^{-1}$ ($p=0,041$), mentre nessuna differenza è stata riscontrata tra controllo e trattamenti.

La figura 3.16 illustra la media di produzione di pellet nei 4 giorni di test. I primi quattro trattamenti risultano comparabili, con valori di pellet medi di produzione da $108 \pm 13,9(\text{ES})$ nel controllo a $118 \pm 21,6(\text{ES})$ nella concentrazione $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$. L'ultimo trattamento, corrispondente alla concentrazione maggiore, risulta anche in questo caso inferiore rispetto agli altri, con una media di $79 \pm 8,29(\text{ES})$.

L'ANOVA a una via non ha rilevato differenze significative tra le medie dei pellet prodotti nell'arco dei quattro giorni considerati (ANOVA: $p = 0,449$).

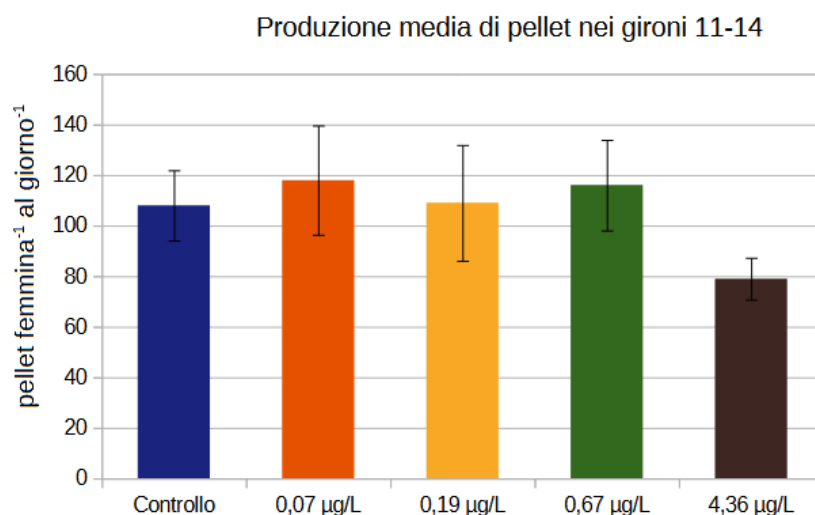


Figura 3.16 - Produzione medi di pellet dal giorno 11 al giorno 14. Le concentrazioni in ascisse sono espresse in $\mu\text{g L}^{-1}$. Barre d'errore espresse come errore standard.

Nella figura 3.17 viene illustrata la distribuzione dei dati tramite ridgeline plot (joyplot). Il controllo (azzurro) risulta avere una maggior concentrazione in un intervallo intorno a 120 pellet, ma la porzione a sinistra che appare come coda appiattita indica che alcuni individui hanno prodotto meno pellet, provocando una certa disomogeneità nei dati. La concentrazione $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ presenta un gruppo di valori omogeneo, ma alcuni individui con valori tendenzialmente bassi a sinistra, come si può notare dalla porzione di coda a sinistra. I trattamenti centrali invece, $0,19 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,67 \mu\text{g L}^{-1}$ si distinguono per un'elevata variabilità di dati, non si distinguono infatti zone di densità. Infine, la concentrazione $4,36 \mu\text{g L}^{-1}$ (rosso) risulta avere la maggior parte dei valori bassi, come denota la curva rossa spostata a sinistra, ciò indica che rispetto a tutti gli altri trattamenti in questo trattamento si osserva una tendenza a produrre meno pellet. Il secondo picco più piccolo che si vede rappresenta il giorno 14 nel quale vi è stata un'elevata produzione che si discosta dal quantitativo nelle giornate precedenti.

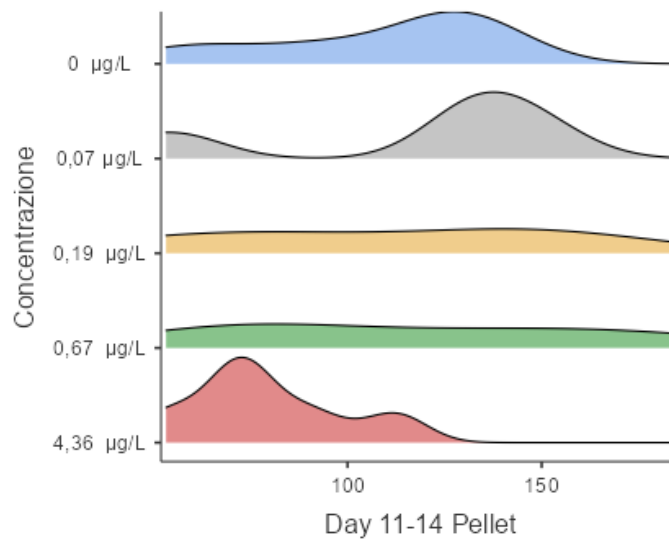


Figura 3.17 - Grafico di densità di Joy per controllo e trattamenti. In ascissa c'è la produzione di pellet media dal giorno 11 al giorno 14 espressa come $\text{pellet femmina}^{-1} \text{ al giorno}^{-1}$, in ordinata vi sono i trattamenti espressi come $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.4.3 Correlazione uova-pellet OCT

Come si può notare in figura 3.18, anche nei test con OCT l'analisi di correlazione di Spearman indica una correlazione positiva significativa fra la produzione di uova e quella di pellet, all'aumentare del numero di uova aumenta anche il metabolismo con l'incremento di pellet ($\rho = 0,774, p < 0,001$).

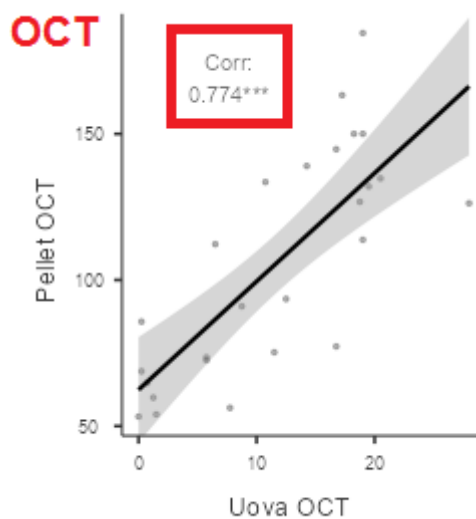


Figura 3.18 - Correlazione positiva fra il numero di uova e pellet ($\rho = 0.843, p < 0.001$) nei quattro giorni di osservazione.

4. DISCUSSIONE:

Nel controllo con acetone, si è utilizzata una concentrazione di solvente pari a $7,3 \text{ mg L}^{-1}$ mentre la massima concentrazione nelle soluzioni test è stata $1,9 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ per EHS e OCT rispettivamente. L'andamento di produzione di uova e di pellet è risultato pressoché lo stesso fra controllo e controllo con acetone, per tutta la durata del test. Considerando inoltre che dal confronto statistico non sono emerse differenze significative, si può quindi affermare che la percentuale di acetone nelle soluzioni test non ha influenzato la produzione di uova e pellet.

4.1 Effetti dell'etilesil-salicilato

Per quanto riguarda il test con EHS, il giorno 13 l'analisi statistica ha riscontrato una differenza significativa fra il controllo e la concentrazione maggiore di contaminante ($7,46 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), confermando un effetto inibitorio nella produzione di uova come risultato dell'esposizione a EHS. Sebbene nelle giornate 11, 12 e 14, le analisi statistiche non abbiano evidenziato differenze significative fra controllo e trattamenti, la quantità di uova rilevata nella concentrazione $7,46 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ presenta una diminuzione del 70-80% rispetto al controllo.

Nell'analisi statistica della produzione media di uova complessiva delle giornate 11-14, il test ANOVA a una via ha restituito un valore di significatività borderline ($p = 0,045$). Tuttavia, l'applicazione del test *post-Hoc* di Tukey non ha evidenziato differenze statisticamente significative nei confronti a coppie. Tale livello di incertezza si può attribuire al diverso bilanciamento fra i due test in termine di errore di tipo I (Chen et al., 2018). In presenza di una variabilità elevata e omoschedasticità borderline (Levene $p = 0,065$) si può incorrere in falsi positivi, come nel caso di un possibile errore di prima specie con ANOVA, che ha rifiutato l'ipotesi H_0 , rivelatasi in realtà corretta con l'esecuzione del test di Kruskal-Wallis. Nel caso specifico, la situazione borderline suggerisce che la potenza statistica dei test effettuati non si sia rivelata sufficiente per discriminare in modo preciso differenze significative. Alcuni autori suggeriscono l'utilizzo di altri tipologie di test statistici come Generalized (mixed) o Linear (mixed) models, utilizzati quando le assunzioni di omoschedasticità e normalità non risultino soddisfatte (Agbangba et al., 2024).

Nella produzione di pellet giornaliera non si sono riscontrate differenze significative fra controllo e trattamenti, però anche in questo caso, fra la concentrazione maggiore e il controllo si osserva una diminuzione dal 37-52% nella produzione di pellet.

Se si confrontano la produzione media di uova e di pellet nei quattro giorni si osserva come siano strettamente e positivamente correlate, a indicare che il contaminante ha influenzato sia riproduzione che alimentazione.

Secondo la teoria del *DEB* – *Dynamic Energy Budget*, una riduzione nell'assunzione del cibo da parte di un organismo ha effetti indiretti sulla riproduzione, infatti, dato che l'energia è conservativa, se diminuisce l'introito necessario per il mantenimento dell'individuo, viene prelevata la quota di energia adibita alla riproduzione, in quanto non prioritaria rispetto alla sopravvivenza dell'adulto (Kooijman S. A. L. M., 2010). L'utilizzo della teoria risulta perciò utile per valutare il rischio delle sostanze tossiche a livello di popolazione, estrapolando le informazioni provenienti dai test effettuati sugli individui (Klock, 2012).

Dalle osservazioni effettuate, i copepodi esposti alla maggior concentrazione, il giorno 12 hanno prodotto un quantitativo di pellet di circa la metà rispetto a quello misurato nel controllo, questo fa presupporre, quindi, che si siano nutriti di meno con conseguenze sul numero di uova prodotte il giorno dopo (giorno 13), significativamente differente dal controllo.

A questo punto si possono considerare varie ipotesi:

- 1) I pellet sono diminuiti a seguito di una minore assunzione di cibo, derivante da un minore grazing;
- 2) I pellet diminuiscono in numero e dimensione quando c'è maggiore assimilazione a livello gastrico, per rispondere a una maggiore richiesta di energia da parte dell'organismo;
- 3) Il quantitativo di pellet ben formati e conteggiati si è rivelato minore rispetto alla totalità di escrezione, con un decremento della capacità di assimilazione del nutrimento.

Una sostanza tossica può ridurre l'assunzione di cibo o aumentare i costi di mantenimento o di crescita influenzando quindi la riproduzione (Klock et al, 2012). Nel caso specifico, l'esposizione a etilesil-salicilato può quindi aver alterato l'equilibrio energetico di *A. tonsa*. Nonostante gli organismi si trovassero in condizioni di sovrabbondanza di cibo, il contaminante può aver inibito il grazing agendo sul meccanismo di selezione delle cellule algali o inibendo lo stimolo della fame o il movimento, con effetti di tipo narcotizzante, dato che durante il test non si sono rilevati fenomeni di immobilità.

La sostanza può aver influito sull'assimilazione. Si può ipotizzare che il contaminante abbia agito sull'alimento diminuendone la capacità nutritiva o possono esserci stati scompensi a livello degli

enzimi digestivi impedendo quindi ai copepodi di ricavare il corretto apporto energetico. In ogni caso, ciò che sembra più probabile è che i costi di mantenimento somatico siano aumentati a discapito della riproduzione.

Le considerazioni fatte sono a livello di ipotesi, in quanto la fisiologia dei processi metabolici di EHS non sono ancora noti. Ulteriori approfondimenti sono necessari per stabilire quali effetti vi possono essere a livello enzimatico.

Sebbene i filtri UV siano considerati contaminanti emergenti e la loro presenza in ambiente sia fuori discussione (Wheate N., 2022), gli studi ecotossicologici su alcuni di questi prodotti, come nel caso di EHS, risultano scarsi (Cuccaro, 2022). Molti studi sono stati effettuati su bivalvi e antozoi, ma ne esistono pochi su copepodi e plankton (Hodge et al., 2025). Per quanto riguarda *A. tonsa* non ci sono studi comparabili per confrontare la tossicità di EHS con i dati di letteratura.

L'etilesil-salicilato è risultato essere il secondo filtro UV più tossico (preceduto da octocrilene) per l'esacorallo *Pocillopora damicorni*. Sono stati osservati un'alterazione del profilo lipidico del corallo e un aumento significativo di un particolare steroride (5 α ,8 α -Epidioxyergosta-6,24(28)-dien-3 β -ol) che compare nel caso in caso di esposizione a contaminanti (Stein et al., 2020). Per quanto riguarda il bioaccumulo nei coralli, i dati attualmente disponibili sono scarsi. Si riportano concentrazioni di EHS di 331 ng g⁻¹(peso secco), mentre altre indagini hanno rilevato livelli inferiori al limite di rilevabilità (Mitchelmore et al., 2021).

Alcune specie di crostacei sono state utilizzate per saggiare la tossicità dei filtri UV. Nello studio di Marcin, S. et Aleksander, A. (2023) una batteria di test è stata utilizzata per valutare gli effetti di EHS sia singolarmente che in miscela con altri filtri. Dai test acuti (durata 48h) si è ricavato un valore di EC₅₀ pari a 11,15 mg L⁻¹ per *Daphnia magna* ed in base al risultato la tossicità di EHS è stata valutata come bassa. Per il crostaceo *Artemia francesca* la tossicità a EHS è stata misurata in termini di tossicità acuta, ed ha prodotto una EC₅₀ di 7,45 mg L⁻¹. Nello studio, inoltre, si fa riferimento anche a un comportamento anomalo, con nuoto inverso, che si manifestava in alcuni organismi di *A. francescana* solo a concentrazioni più alte (10 mg L⁻¹), ipotizzando un possibile effetto neurotossico per disfunzioni legate all'enzima acetilcolinesterasi (Marcin, S. et Aleksander, 2023).

Per quanto riguarda gli effetti di miscele di filtri UV comprendenti EHS, in *D. magna* l'esposizione cronica ha rilevato un rallentamento nella comparsa della produzione di uova e un numero significativamente ridotto di nuovi nati (Svigruha, R et al., 2025). Inoltre, alcune combinazioni di filtri UV sembrano essere più tossiche di altre. In un altro lavoro, si sottolinea il fatto che etilesil-salicilato singolarmente non ha dimostrato inibizione del 50% della bioluminescenza in *Aliivibrio*

fischeri (inibizione 30% a 5 e 15 minuti), mentre la combinazione di EHS con Benzofenone-2 ha comportato invece elevato effetto tossico (EC_{50} di 0.88, 0.94 e 1.32 per 5, 15 e 30 minuti rispettivamente)(Marcin et Aleksander, 2023). Per testare la tossicità di una crema solare (prodotto D) contenente sia etilesil-salicitao che octocrilene, Yoo et al. (2025) hanno sotto posto il crostaceo di acqua salmastra *Diaphanosoma celebensis* a diverse concentrazioni. Dallo studio il prodotto si è rivelato tossico in seguito ad esposizione acuta, con LC_{50} a 48h di 57.22% di soluzione preparata con DMSO. Inoltre, è stato riscontrato un ritardo significativo nella deposizione delle uova sia una differenza significativa anche nel numero di uova totale prodotto. C'è da considerare che il test è avvenuto a concentrazioni maggiori (mgL^{-1}) rispetto a quelle riscontrabili in ambiente(μgL^{-1} ; ngL^{-1}), in quanto lo studio si basa sulla previsione di concentrazione di prodotti solari nelle acque di Hong Kong (tra 1.83 and 15.62 $mg L^{-1}$ secondo Wong, 2020).

Gli studi su *Artemia salina* non hanno rilevato effetti tossici acuti per le larve dell'organismo dopo esposizione di 48h, nemmeno a concentrazioni elevate. Si registra una mortalità delle larve di *A. salina* del 40% a $2000\mu g L^{-1}$ (Thorel et al., 2020).

Per i vertebrati, numerosi effetti tossici di EHS sono stati riscontrati da Lu et al. (2025) sulla specie test, *Danio rerio*, piccolo pesce d'acqua dolce (zebrafish). Tra gli effetti si annoverano scompensi cardiaci, malformazioni embrionali, stress ossidativo e alterazioni comportamentali. Sebbene siano stati testati a concentrazioni molto superiori a quelle che si riscontrano in ambiente, è interessante notare come a $5 mgL^{-1}$ EHS abbia indotto iperattività, mentre a concentrazioni di $50 mgL^{-1}$ ha portato a soppressione locomotoria, suggerendo tossicità neurologica.

Effetti di EHS sul fitoplancton sono limitati. Si riporta una diminuzione significativa del tasso di crescita di *Tetraselmis spp* del 24% rispetto al controllo, dopo 7 giorni di esposizione a EHS a $1 mg L^{-1}$ e riduzione dell'attività esterasica alla concentrazione di $10 \mu g L^{-1}$. L'esterasi è un enzima che promuove l'idrolisi di esteri e amidi e fa parte di quegli enzimi che agiscono su sostanze xenobiotiche simili a sostanze endogene per renderle idrolizzate e quindi più facilmente eliminabili (Newman, 2015). Un aumento o una diminuzione dell'attività esterasica è un segnale di tossicità utilizzato come biomarker negli organismi acquatici (Badatalamenti, PhD tesi, 2024).

4.2 Effetti dell'ocrilene

Per quanto riguarda la produzione di uova, i dati raccolti nel test con octocrilene hanno presentato maggiore variabilità rispetto all'analisi con EHS. Le differenze individuali e il numero basso di repliche di alcune unità sperimentali hanno comportato una distribuzione dei dati non normale o una omogeneità delle varianze non rispettata, in tutte le giornate del test. Per queste ragioni è stato utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis che però non ha evidenziato differenze

significative tra controllo e trattamenti nella produzione di uova. Nonostante ciò, si è osservata una diminuzione nella produzione di uova alla concentrazione $4,36 \mu\text{g L}^{-1}$, con diminuzione dal 65-83% nei giorni 11-12-13 e del 45% il giorno 14. Per la durata del test si è osservato un trend generale decrescente del numero di uova all'aumentare della concentrazione.

Analogamente alla produzione di uova, anche in quella dei pellet non sono emerse differenze significative tra controllo e trattamenti, sebbene sia interessante notare la variazione nell'alimentazione di *A.tonsa* nell'arco del test. Nei primi giorni, alla concentrazione di $4,36 \mu\text{g L}^{-1}$, si è notato un rallentamento metabolico con bassi valori di produzione di pellet rispetto al controllo, mentre l'ultimo giorno il quantitativo di pellet arriva a uniformarsi a quello delle altre unità sperimentali. Essendo che il mix algale con cui sono stati nutriti i copepodi è stato rinnovato giornalmente ed era uguale per tutti i gruppi, si tende a escludere ci siano stati fenomeni di stress nutrizionale, per cui il fatto che i primi giorni si siano nutriti o abbiano assimilato di meno può essere un effetto dovuto all'esposizione con octocrilene. Il giorno 14 la richiesta energetica potrebbe essere aumentata a causa dei costi di gestione del contaminante nell'organismo che si sono andati a sommare a quelli di mantenimento. Nello stesso giorno si osserva infatti un aumento della produzione di uova, con una diminuzione inferiore del 45% rispetto al controllo, a fronte di una produzione di pellet maggiore del controllo di circa 10%. In altre parole, sembra che dall'esposizione di OCT alla maggiore concentrazione, gli individui abbiano dovuto nutrirsi di più per riuscire però a produrre solo la metà di uova rispetto al controllo.

Anche nel caso di OCT, le uova sono fortemente correlate ai pellet. Il fatto non si sia osservato un aumento drastico di produzione di uova il quarto giorno, come nella produzione di pellet, può essere spiegato con la teoria del DEB, per la quale l'energia viene spesa secondo una dinamica di priorità: l'investimento per la riproduzione è diminuito o azzerato se vi è un incremento dei costi per mantenere l'individuo sano, come potrebbero essere i costi dovuti alla detossificazione o compensazione della sostanza tossica con cui il copepode è entrato in contatto.

Nel caso di questo lavoro di tesi, è possibile che la potenza statistica dei metodi utilizzati (ANOVA e test di Kruskal-Wallis) non fosse sufficiente a discriminare in modo adeguato l'effetto di octocrilene su riproduzione e alimentazione di *A. tonsa*. La variabilità naturale, che raramente rispecchia una distribuzione dei dati di tipo gaussiano, pone la necessità in molti studi ecologici di considerare i dati secondo una distribuzione di Poisson (O'Hara, 2010). Perciò è possibile che utilizzando un altro tipo di tecniche statistiche, che invece di utilizzare i valori medi vadano ad analizzare i trend (come, ad esempio, Generalized Linear Mixed Model – GLMM), si sarebbero potute avere delle risposte più precise, in grado di spiegare i trend osservati.

La forte discrepanza nella produttività di uova e pellet denota degli effetti biologici che, anche se non risultati significativi, meritano di essere indagati in modo più approfondito.

A differenza dell'EHS, gli studi sull'octocrilene sono più numerosi, specialmente per quanto riguarda gli antozoi (Hodge, 2025).

Svariati lavori scientifici indicano come questo composto si distingua per essere uno dei filtri solari con il maggiore impatto sugli organismi acquatici; i relativi dati ecotossicologici sono stati sintetizzati e raggruppati nella Tabella 4.1, in base a una recente review di Mota et al.(2025). Per contro, alcuni autori criticano il fatto che molti studi sono stati eseguiti con concentrazioni di OCT al di sopra del limite di solubilità della sostanza in acqua. Per questa ragione l'OCT non mostrerebbe tossicità acuta verso organismi acquatici, non essendo la sostanza disciolta in acqua. Tuttavia, in alcuni test cronici, come ad esempio con *Daphnia magna*, l'OCT è risultato altamente tossico (Duis, 2022).

TIPO DI ORGANISMO	VALORI DI TOSSICITA'
Alghe	$EC_{50} \geq 150 \mu\text{g L}^{-1}$
Invertebrati	$EC_{50} \geq 23 \mu\text{g L}^{-1}$ $LC_{50} = 0,6 \text{ mg L}^{-1}$
Vertebrati	$LC_{50} = 91,02 \text{ mg L}^{-1}$

Tabella 4.1 - Raccolta valori di tossicità di octocrilene su organismi acquatici (Mota et al. 2025).

L'octocrilene è risultato il più tossico tra i filtri UV testati su *Pocillopora damicorni*(Antozoi – esacorallo) inducendo una disfunzione mitocondriale di risposta allo stress alla concentrazione di $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Inoltre, gli autori espongono le loro preoccupazioni sull'accumulo nei tessuti dei derivati di OCT che, date le caratteristiche lipofile, comportano un rischio di biomagnificazione(Stein, 2020).

Un altro studio più recente ha evidenziato le stesse risposte biochimiche in un'altra specie di corallo, *Stylophora pistillata*, che a seguito dell'esposizione a octocrilene ha presentato le stesse risposte metabolomiche di *Pocillopora damicorni* e accumulo nei tessuti di glicosidi e acidi grassi derivati dalla trasformazione del contaminante, confermando un effetto nocivo per la salute dei coralli. Questi risultati risultano essere più preoccupanti rispetto al solo fenomeno di sbiancamento, che non sembra essere provocato da octocrilene (Thorel, 2022). Tsui et al. (2017) al contrario non ha riscontrato quantità di OCT nei tessuti di coralli i cui valori sono sotto il limite di rilevabilità, mentre Mitchelmore et al. (2021) riportano valori di OCT di $48,4 \text{ ng g}^{-1}$ in peso secco.

Effetti di tossicità acuta si sono riscontrati in termini di inibizione della bioluminescenza nel batterio *Aliivibrio fischeri* da (Lozano, 2020; Marcin et Aleksande, 2023), mentre in altri studi con *A. fischeri* octocrilene è risultato essere il meno tossico fra il gruppo di filtri UV testati da Sanches et al., 2021, nel cui studio non c'è stata inibizione di bioluminescenza (concentrazioni OCT nominali in intervallo da 5-15 mg L⁻¹).

Diverse sono le prove di tossicità effettuate su bivalvi, come misura biomarker e valutazione dell'embriotossicità. Per *Mytilus galloprovincialis* è stata calcolata una EC₅₀>650µg L⁻¹ relativa allo sviluppo larvale (Giraldo et al., 2017). Nel caso di *Mytilus edulis* la ricerca si è focalizzata sull'impiego di biomarker per monitorare gli effetti sub-letali del contaminante. La specie è stata testata con octocrilene e ensulizolo (noto anche come UV-T, è un assorbitore UV sulfonato) in concentrazioni 10-100 µg L⁻¹ che hanno provocato gravi effetti quali: stress ossidativo, genotossicità, apoptosi e disregolazione del sistema di biotrasformazione degli xenobiotici (Falfushynska et al., 2021).

Nel test di embriotossicità con larve dell'ostrica *Magallana gigas*, effettuato da Carvalhais et al. (2025), octocrilene ha influito sulla corretta formazione degli embrioni, con effetti significativi di malformazione. Gli organismi sono stati esposti a concentrazioni riscontrabili in ambiente, con intervallo da 1-100µg L⁻¹ (Carvalhais et al., 2025).

Nel gruppo degli Echinodermi, *Paracentrotus lividus* è stato esposto a concentrazioni nominali di OCT di 5-150 µg L⁻¹, dimostrando una maggiore tossicità nello sviluppo larvale rispetto a *M. galloprovincialis*, con valori di EC₁₀ = 162 µg L⁻¹ e EC₅₀ = 737µg L⁻¹ (Giraldo et al. (2017).

Larve di *P. lividus* sono state esposte in un altro studio a a creme solari SPF +50 in diverse concentrazioni (10-50 µL L⁻¹). La percentuale di malformazione nelle 24h è risultata 40-80% rispetto al controllo nei due prodotti contenenti octocrilene (Corindalesi et al., 2017).

Nel test di spermio tossicità con *Arbacia punctulata* gli autori Burns et al. (2025) hanno riportato valori di EC₁₀ = 41.5µg L⁻¹ per l'octocrilene.

I naupli di *Artemia salina* sono stati esposti per 48h a octocrilene mostrando una differenza significativa nella sopravvivenza dei naupli alla concentrazione maggiore (2 mg L⁻¹) con una percentuale di mortalità che ha raggiunto 88 ± 16% con un valore di LC₅₀ = 0,6 mg L⁻¹, più alto fra i filtri UV testati (Thorel, 2020).

Nei test di tossicità acuta, *Daphnia magna* presenta EC₅₀ con valori superiori a 23 µg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ in soluzione di OCT, per cui non risulterebbe tossicità acuta per questa specie, mentre il test cronico (di durata 21 giorni) ha evidenziato una NOEC di 2,66 µg L⁻¹ (Duis, 2022).

Per quanto riguarda le microalghe, in *Tetraselmis spp* OCT ha indotto un leggero ma significativo aumento del tasso di crescita a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ dovuto a ormesi e un decremento dell'attività esterasica a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ a seguito di un'esposizione a 7 giorni con il suddetto filtro UV.

4.3 Considerazioni e prospettive future

Indagando la presenza di OCT e EHS nelle acque, si riscontrano quantitativi molto variabili a seconda delle zone e periodo di campionamento, non è quindi facile stabilire la reale concentrazione di queste sostanze nelle matrici ambientali.

Nelle acque dolci, i valori di concentrazioni di OCT tipici sono intorno a $251\text{-}283 \text{ ng L}^{-1}$ con picchi di 1710 ng L^{-1} nel caso dei laghi con presenti attività ricreative. Mentre nelle acque marine i valori variano da sotto il limite di rilevabilità a valori medi di 420 ng L^{-1} o 377 ng L^{-1} , anche se si riportano valori anche di 7301 ng L^{-1} in aree marine a scarso ricambio idrico (Duis, 2022). Altri autori, riportano valori nelle acque marine intorno a $172 \mu\text{g L}^{-1}$ per OCT e $1,03 \mu\text{g L}^{-1}$ per EHS, mentre nelle acque di scarico si trovano generalmente valori maggiori come $208 \mu\text{g L}^{-1}$ e 320 ng L^{-1} rispettivamente (Lu et al., 2025). In uno studio recente, campioni d'acqua prelevati a largo delle coste di Riccione, in una zona molto frequentata dai bagnanti, sono stati analizzati riscontrando valori molto elevati di EHS e OCT $10,900 \text{ ng L}^{-1}$ e $23,100 \text{ ng L}^{-1}$ rispettivamente (Zulfiqar et al., 2026).

L'ingresso in ambiente ha poi diverse fonti, dirette e indirette, che necessitano di un'attenzione caso per caso, valutando i diversi livelli di impatto antropogenico, come l'uso ricreativo e turistico delle acque costiere, ma anche l'impatto dello scarico delle acque reflue, a seconda di che tipo di trattamento hanno ricevuto in impianto. Anche l'aspetto idrodinamico va tenuto fortemente in considerazione, differenziando siti soggetti a differente ricambio idrico ed elevato idrodinamismo.

Il carattere lipofilico di entrambe le sostanze le rende poco solubili in acqua, esse tendono infatti a non rimanere in fase acquosa, con concentrazioni effettive del 70-80 % in meno dopo 48h rispetto alle concentrazioni nominali al tempo zero (Giraldo, 2017). Nonostante l'esposizione risulti essere inferiore rispetto alla situazione iniziale, si registrano effetti tossici di varia natura: molecolari, cellulari, individuale e di comunità (Hodge, 2025), con maggior rilevanza nel caso di test cronici (Duis, 2022). Essendo maggiore l'affinità di queste sostanze per la matrice sedimento, sono da aumentare sia le indagini per stabilire le concentrazioni di OCT e EHS nei sedimenti, che i test ecotossicologici per determinare effetti sulle comunità bentoniche.

Sono necessari altri approfondimenti soprattutto per comprendere i reali meccanismi d'azione di questo tipo di contaminanti emergenti. Pochi sono gli studi sui metaboliti e le alterazioni che le

sostanze possono subire sia in ambiente che a seguito di processi di detossificazione all'interno degli organismi stessi. Il quadro conoscitivo attuale richiede ulteriori indagini metabolomiche, biochimiche e istologiche. Permangono inoltre lacune conoscitive sui processi di bioaccumulo che risultano tutt'ora frammentarie e con risultati non sempre confrontabili. La quantità di composti testata è limitata, con prove principalmente sui molluschi (Hodge, 2025) e sui coralli (Mitchelmore et al., 2020). Studi su bioaccumulo e biomagnificazione andrebbero implementati, considerando dinamiche di uptake in base alla dieta e al comparto ambientale di appartenenza (Hodge, 2025). Ricerche future dovrebbero focalizzarsi a livello di comunità implementando l'utilizzo di batterie di test che possano coprire più livelli trofici, in quanto è da non sottovalutare il potenziale effetto a livello ecosistemico di queste sostanze.

5. CONCLUSIONE

Il rischio derivante dall'esposizione solare in termini di carcinogenesi ha portato a campagne di prevenzione con obiettivo di proteggere la salute umana. Ne è conseguito un aumento della produzione e dell'utilizzo di prodotti cosmetici contenenti composti in grado di schermare la pelle dai raggi UVB e UVA, responsabili di causare tumori della pelle, fotoinvecchiamento e danni oculari. L'ampio consumo di cosmetici contenenti filtri solari e l'esteso utilizzo di tali composti in molteplici materiali per preservare polimeri e pigmenti dalla fotodegradazione, hanno reso i filtri UV ubiquitari nell'ambiente.

L'ingresso in ambiente avviene in modo diretto con il rilascio dalla pelle dei prodotti solari, ma anche in modo indiretto con lo scarico delle acque proveniente dagli impianti di trattamento, che presentano un abbattimento incompleto di queste sostanze. Il destino dei filtri UV, così come il tipo di metaboliti che si possono creare e le concentrazioni in ambiente sono ancora oggetto di studio e in letteratura si riscontrano valori di concentrazioni molto ampi e non univoci. Sebbene non sia ancora definita la quantità dei filtri UV rinvenibile in ambiente, la maggior parte dei dati di letteratura riporta danni di varia natura agli organismi acquatici, soprattutto nel caso di esposizione cronica. L'accumulo di queste sostanze, in seguito a rilascio nelle acque, ha sollevato negli ultimi anni grande preoccupazione per via della persistenza, potenziale bioaccumulo e tossicità a organismi acquatici, rendendo i filtri UV contaminanti emergenti in grado di causare danni agli ecosistemi acquatici.

La pressione ambientale esercitata da tali composti è testimoniata dal fatto che le due sostanze oggetto di studio siano attualmente in fase di revisione normativa. Il presente lavoro di tesi ha permesso di approfondire l'impatto ecotossicologico di due filtri UV ampiamente diffusi, inserendosi in un contesto di crescente preoccupazione ambientale e normativa.

Le due sostanze che sono state oggetto di studio di questa tesi sono due filtri UV ampiamente utilizzati etilesil salicilato (EHS) e octocrilene (OCT). L'uso massimo consentito nei cosmetici dall'attuale normativa europea (Allegato VI, n. 1223/2009) in corso di validità è del 5% e 10%, rispettivamente. Attualmente EHS e OCT sono sotto stretta sorveglianza dagli organi preposti alla regolamentazione europea per le indicazioni di rischio a loro associate quali sospetta interferenza endocrina e danni al feto, nonché tossicità elevata per gli organismi acquatici. In base ai dati raccolti e ai potenziali rischi associati alle suddette sostanze, potrebbero essere applicate pesanti restrizioni all'uso.

Il presente lavoro di tesi ha avuto lo scopo di valutare l'impatto di due filtri UV sulla riproduzione e alimentazione del copepode calanoide *A. tonsa*, specie test molto apprezzata in ecotossicologia per la sensibilità, allevabilità in laboratorio e approfondita conoscenza di biologia ed ecologia. Il

copepode *A. tonsa* è una specie chiave per comprendere i potenziali impatti di questi contaminanti emergenti sulle comunità acquatiche, essendo fondamentale il loro ruolo trofico come pascolatori e predatori di plancton marino e prede di moltissime specie di pesci e uccelli.

Individui di *A. tonsa* sono stati inizialmente esposti a diverse concentrazioni di EHS e OCT dallo stadio di uova fino al raggiungimento della maturità sessuale. In seguito sono state prelevate alcune femmine riproduttive per ciascuna unità sperimentale e sono state misurate le uova e i pellet prodotti giornalmente, come proxy di riproduzione e alimentazione.

Nel caso di EHS si è riscontrata una differenza significativa fra la produzione di uova e la concentrazione massima di contaminante, mentre nella produzione di pellet non sono emerse differenze significative fra i trattamenti. Nel caso di OCT invece non sono emerse differenze significative tra controllo e trattamenti né per la produzione di uova, né per la produzione di pellet. Nonostante ciò, in entrambe le sostanze la produzione di uova è risultata fortemente e positivamente correlata alla produzione di pellet. Sebbene l'analisi statistica non abbia rilevato differenze, i trend di diminuzione nella produzione di uova e pellet sono ben visibili per entrambe le sostanze con diminuzioni dal 50-80% rispetto al controllo. Va tuttavia sottolineato che, nonostante i trend biologici fossero ben visibili, la potenza statistica dell'analisi non ha sempre permesso di confermare tali evidenze a causa dell'elevata variabilità intrinseca dei test biologici. Si ipotizza che l'uso di analisi statistica quale come il GMLN, sarebbe stato più preciso nell'interpretazione dei dati e dei trend osservati.

Le ipotesi riguardo agli andamenti osservati sono state fatte in base alla teoria Dynamic Energy Budget, che può contribuire nell'interpretazione di dati ecotossicologici fornendo chiavi di lettura meccanicistiche e favorendo un approccio più integrato nel contesto ecologico. In base alla teoria, è verosimile che l'energia assunta dall'alimentazione possa essere stata in gran parte utilizzata per la gestione del contaminante nell'organismo, con relativa diminuzione della quota di energia da investire nella riproduzione. Analogamente, la quantità inferiore di pellet riscontrata nei trattamenti rispetto al controllo, può ricondursi a effetti di tipo narcotizzante dei contaminanti, che hanno alterato il grazing dei copepodi, comportando una minore ingestione di cibo. Effetti del contaminante sull'assimilazione non possono altresì essere esclusi, ma necessitano di studi approfonditi con uso di biomarker per comprendere adeguatamente i meccanismi fisiologici di azione dei contaminanti in *A. tonsa*.

Gli effetti sub-letali riscontrati in questo lavoro di tesi su riproduzione e alimentazione in *A. tonsa*, meritano approfondimenti e ulteriori studi per comprendere la cinetica e la dinamica dei filtri UV per stabilire l'impatto sugli ecosistemi acquatici. In base ai dati raccolti e presenti in letteratura, la valutazione del rischio per i filtri UV non sembra prescindere da studi a lungo termine. Sono

necessari studi a livello di biomarker per comprendere l'effetto delle sostanze a livello enzimatico e batterie di test per una migliore comprensione degli effetti a livello di comunità. Inoltre sono auspicabili test sui sedimenti in quanto la lipofilità delle sostanze sembra comportare maggiore affinità per il comparto sedimento, con potenziale impatti anche sulle comunità bentoniche.

In ottica futura, appare infine auspicabile implementare la ricerca con test di miscela, per comprendere l'effetto sinergico di miscele di filtri UV considerando che la quantità e diversità negli ingredienti di cosmesi ha un differente destino ambientale.

RINGRAZIAMENTI

Finalmente posso appendere il camice della scrittura tecnica e rimettermi il pigiama della scrittura narrativa. Abbiate pazienza, ma un pezzo in piena libertà dovevo pur scriverlo, almeno nei ringraziamenti. Bando alle ciance e passiamo a fare i ringraziamenti, che non sono in ordine, ma come mi escono, non abbiatene a male.

Primo fra tutti, ringrazio il mio relatore Marco Picone a cui devo tantissimo. Posso affermare che quasi tutto quello che so di ecotossicologia fa capo a lui. Lo ringrazio di cuore per tutta la pazienza a me riservata, la professionalità e la simpatia con cui mi ha assistito in questo lavoro di tesi che è stato per me una delle più belle sfide mai affrontate e mi sta dando, a prescindere da come vada la valutazione, una enorme soddisfazione personale. Ringrazio poi la mia correlatrice Annamaria Volpi Ghirardini, per tutto ciò che mi ha insegnato e per avermi spronato ad andare avanti.

Ringrazio poi tutti i miei amici (molti conosciuti proprio qui) e i miei compagni di corso, non sarei dove sono oggi se non avessi avuto anche il vostro aiuto.

Ringrazio poi i miei genitori, senza il loro supporto non avrei avuto la possibilità di studiare e appassionarmi alle materie di questo corso di laurea. Non mi è mai mancato da parte loro, neanche una volta, l'in bocca al lupo prima dell'esame.

Ci tengo poi a ringraziare in particolare la migliore collega che si possa avere, che ha sempre creduto in me e mi ha sempre spronato a continuare anche nei più bui momenti di sconforto, ricordandomi quanto fosse importante che riprendessi e finissi la magistrale monca che avevo dovuto abbandonare per far fronte ad altre questioni personali.

Un ringraziamento speciale va al mio compagno, per tutti gli anni in cui mi ha supportato aiutandomi a gestire la mia tristezza paralizzante.

E infine ringrazio anche me stessa, perché nonostante un'autostima claudicante che è stata come una palla al piede per moltissime cose, sono arrivata fin qui e posso dire di avercela fatta, non in modo perfetto, ma al massimo delle mie possibilità.

Grazie.

BIBLIOGRAFIA

Andersen H.R., Wollenberger L., Halling-Sørensen B., Kusk K.O. (2001), *Development of copepod nauplii to copepodites - A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption*. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2821–2829.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620201222>

Agbangba, C. E., Aide, E. S., Honfo, H., & Kakai, R. G. (2024). *On the use of post-hoc tests in environmental and biological sciences: A critical review*. *Heliyon*, 10(3).

Avancini M., Cicero A.M., Di Girolamo I., Innamorati M., Magaletti E., Sertorio Zunini T., *Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani, Vol. II – Zooplancton neritico*. (eds.) (2006). Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare - ICRAM, Roma.

Baas, J., Augustine, S., Marques, G. M., & Dorne, J. L. (2018). *Dynamic energy budget models in ecological risk assessment: From principles to applications*. *Science of the Total Environment*, 628, 249-260.

Badalamenti R., *Estratti di macroalghe *Ericaria crinita*, *Ericaria brachycarpa* e *Asparagopsis taxiformis*: dagli effetti sul riccio di mare *Arbacia lixula* (Linneo, 1758) alle potenziali applicazioni*, [PhD Thesis]. Palermo: Università degli studi di Palermo; 2024.

Barnes R.S.K., Hughes R.N., *Introduzione alla ecologia marina*, Piccin editore, 1990.

Betancor Mónica B., Ortega Aurelio, Fernando de la Gándara, Varela Jose L., Tocher Douglas R., Mourente Gabriel, (2019), *Evaluation of different feeding protocols for larvae of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.)*, *Aquaculture*, Volume 505, Pages 523-538, ISSN 0044-8486.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.063>

Burns, E. E., Mitchelmore, C., Williams, J., Heyes, A., Gonsior, M., & Davies, I. A. (2025). *Chronic toxicity of the ultraviolet filter octocrylene to the sea urchin, *Arbacia punctulata**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 44(8), 2186-2197.

Buskey, E.J. (1994), *Factors affecting feeding selectivity of visual predators on the copepod *Acartia tonsa*: locomotion, visibility and escape responses*. *Hydrobiologia* 292, 447–453.
<https://doi.org/10.1007/BF00229971>

Buttino I., Vitiello V., Macchia S., Pellegrini D.,(2022), *Saggio subcronico di inibizione della mobilità naupliare a 7 giorni con il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848)*. *Quaderni di Ecotossicologia*. ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 17/22, 2022.

Cadena-Aizaga M. I.I, Montesdeoca-Esponda S., Sosa-Ferrera Z.,Santana-Rodríguez J.J., (2022) *Occurrence and environmental hazard of organic UV filters in seawater and wastewater from Gran Canaria Island (Canary Islands, Spain)*, *Environmental Pollution*,Volume 300, 118843, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118843>.

Carvalhais, A., Lippa, R., Oliveira, I.B., Di Lorenzo, G., Mieiro, C., Pacheco, M., (2025). *Effects of the UV filter octocrylene and its degradation product benzophenone on Pacific oyster (*Magallana gigas*) larvae: a call for reassessment of environmental hazards*. *Toxics* 13, 177.
<https://doi.org/10.3390/TOXICS13030177>, 2025.

- Chen, T., Xu, M., Tu, J., Wang, H., & Niu, X. (2018). *Relationship between Omnibus and post-hoc tests: an investigation of performance of the F test in ANOVA*. *General Psychiatry*, 30(1), 60-64.
- Corinaldesi, C., Damiani, E., Marcellini, F., Falugi, C., Tiano, L., Brugè, F., & Danovaro, R. (2017). *Sunscreen products impair the early developmental stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus**. *Scientific reports*, 7(1), 7815.
- Cuccaro A., Freitas R., De Marchi L., Oliva M., Pretti C. (2022), *UV-filters in marine environments: a review of research trends, meta-analysis, and ecotoxicological impacts of 4-methylbenzylidene-camphor and benzophenone-3 on marine invertebrate communities*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **29**, 64370–64391. (doi:10.1007/s11356-022-21913-4)
- D'Agostinis G. e Mignini E. (a cura di), *Manuale del cosmetologo*, editore Tecniche nuove, 2007.
- D'Agostinis, G., & Mignini, E. (2014). *Manuale del cosmetologo: le formule cosmetiche*. Tecniche Nuove.
- D'Amico, M., Gambaro, A., Barbante, C., Barbaro, E., Caiazzo, L., Vecchiato, M., (2022). *Occurrence of the UV-filter 2-Ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC) in Antarctic snow: first results*. *Microchem. J.* 183, 108060. MICROC.2022.108060 <https://doi.org/10.1016/J>
- De Miranda, L. L. R., Harvey, K. E., Ahmed, A., & Harvey, S. C. (2021). *UV-filter pollution: current concerns and future prospects*. *Environmental monitoring and assessment*, 193(12), 840.
- Duis K., Thomas Junker, Anja Coors, (2022), *Review of the environmental fate and effects of two UV filter substances used in cosmetic products*, *Science of The Total Environment*, Volume 808, 2022, 151931, ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151931>
- ECHA (2025). *Annex XV Restriction Report - Proposal for a Restriction on Octocrylene*. European Chemicals Agency. Disponibile su: <https://echa.europa.eu/home>. Consultato il 21 febbraio 2026.
- Falfushynska H., Eugene P. Sokolov, Kathrin Fisch, Hatem Gazie, Detlef E. Schulz-Bull, Inna M. Sokolova, (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*, Volume 798, 2021, 149171, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149171>.
- García-García P., Ospina, M. & Señoráns, F.J. (2024) *Tisochrysis lutea as a source of omega-3 polar lipids and fucoxanthin: extraction and characterization using green solvents and advanced techniques*. *J Appl Phycol* 36, 1697–1708. <https://doi.org/10.1007/s10811-024-03233-x>
- Girardo, A., Montes, R., Rodil, R. et al., (2017), *Ecotoxicological Evaluation of the UV Filters Ethylhexyl Dimethyl p-Aminobenzoic Acid and Octocrylene Using Marine Organisms Isochrysis galbana, Mytilus galloprovincialis and Paracentrotus lividus*. *Arch Environ Contam Toxicol* **72**, 606–611. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0399-4>
- Guillard R.R. 1975, *Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates*. In: Smith W.L., Chanley M.H. (eds), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. pp. 29-60, Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

Gupta, Asheesh & Avci, Pinar & Dai, Tianhong & Huang, Ying-Ying & Hamblin, Michael. (2013). *Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. Advances in wound care. 2.* 422-437. 10.1089/wound.2012.0366. (Imagine)

Hodge A.A., Hopkins Frances E., Mahasweta Saha, Awadhesh N. Jha, (2025), *Ecotoxicological effects of sunscreen derived organic and inorganic UV filters on marine organisms: A critical review*, Marine Pollution Bulletin, Volume 213, 2025,117627,ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.117627>

Iserentant R. and De Sloover, J., (1976). *Le concept de bioindicateur*. Mem. Soc. Roy. Bot. Belg. 7, 15-24.

ISO, 1999 Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). ISO 14669:1999(E)

ISO, 2015, Water Quality – *Calanoid Copepod early-life Stage Test with Acartia tonsa* – ISO, 16778, 2015.

Kleppel, G. S., (1993) *On the diets of calanoid copepods*. Marine Ecology Progress Series, 99, 183-195, 1993. <https://doi.org/10.3354/MEPS099183>

Klok, C., Hjorth, M., & Dahllöf, I. (2012). *Qualitative use of Dynamic Energy Budget theory in ecotoxicology: Case study on oil contamination and Arctic copepods*. Journal of sea research, 73, 24-31.

Kooijman, S. A. L. M., *Dynamic Energy Budget Theory for Metabolic Organisation.*, 3rd ed., Cambridge UP, 2010.

Kwon, B., & Choi, K. (2021). *Occurrence of major organic UV filters in aquatic environments and their endocrine disruption potentials: A mini-review*. Integrated Environmental Assessment and Management, 17(5), 940-950.

Kusk K.O., Avdolli M., Wollenberger L. (2011), *Effect of 2,4-dihydroxybenzophenone (BPI) on early life-stage development of the marine copepod Acartia tonsa at different temperatures and salinities*. Environ. Toxicol. Chem. 30, 959–966. (doi:10.1002/etc.458)

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.

Lozano, C., Givens, J., Stien, D., Matallana-Surget, S., Lebaron, P., (2020). *Bioaccumulation and toxicological effects of UV-Filters on marine species. In: Sunscreens in Coastal Ecosystems: Occurrence, Behavior, Effect and Risk*. Handbook of Environmental Chemistry. Springer, pp. 85–130. https://doi.org/10.1007/698_2019_442

Lu, X., Sun, L., Chen, J., Wang, J., Guan, M., & Xu, S. (2025). *Comparative Molecular Insights into Developmental and Behavioral Toxicity Induced by Octocrylene and Ethylhexyl Salicylate Exposure on Zebrafish*. Integrative Zoology.

Marcus, Nancy H.; Wilcox, Jeffrey A. *A Guide To The Meso-Scale Production Of The Copepod *Acartia Tonsa**, Florida State University, Department of Oceanography, Biological Oceanography, 2007.

Mitchelmore Carys L., Emily E. Burns, Annaleise Conway, Andrew Heyes, Iain A. Davies, (2021) *A Critical Review of Organic Ultraviolet Filter Exposure, Hazard, and Risk to Corals*, Environmental Toxicology and Chemistry, Volume 40, Issue 4, 1 April 2021, Pages 967–988, <https://doi.org/10.1002/etc.4948>

Marcin, S., Aleksander, A. (2023), *Acute toxicity assessment of nine organic UV filters using a set of biotests*. Toxicol Res. **39**, 649–667. <https://doi.org/10.1007/s43188-023-00192-2>

Mota S., Emilia Sousa, Maria Teresa Cruz, Isabel Martins de Almeida, (2025) *Occurrence and ecotoxicity of cosmetic ingredients in aquatic ecosystems: A narrative review*, Emerging Contaminants, Volume 11, Issue 3, 2025, 100512, ISSN 2405-6650. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2025.100512>

Newman, M. C., *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution* (4th ed.), CRC Press, 2015.

O'HARA, Robert; KOTZE, Johan. Do not log-transform count data. *Nature Precedings*, 2010, 1-1.

OECD (2019), *Guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals – Series on testing and assessment*, No. 23 (Second Edition), JT03442844.

Pereira, H.; Silva, J.; Santos, T.; Gangadhar, K.N.; Raposo, A.; Nunes, C.; Coimbra, M.A.; Gouveia, L.; Barreira, L.; Varela, J. (2019) *Nutritional Potential and Toxicological Evaluation of *Tetraselmis* sp. CTP4 Microalgal Biomass Produced in Industrial Photobioreactors*. *Molecules*, **24**, 3192. <https://doi.org/10.3390/molecules24173192>

Picone M., Bergamin M., Delaney E., Ghirardini A.V., Kusk K.O. (2018) *Testing lagoonal sediments with early life stages of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): An approach to assess sediment toxicity in the Venice Lagoon*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **147**, 217–227. (doi:10.1016/j.ecoenv.2017.08.042)

Picone M., Distefano G.G., Marchetto D., Russo M., Vecchiato M., Gambaro A., Barbante C., Ghirardini A.V. (2021) *Fragrance materials (FMs) affect the larval development of the copepod *Acartia tonsa*: An emerging issue for marine ecosystems*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **215**, 112146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112146>

Picone M., Distefano G.G., Marchetto D., Russo M., Baccichet M., Brusò L., Zangrando R., Gambaro A., Volpi Ghirardini A. (2022). *Long-term effects of neonicotinoids on reproduction and offspring development in the copepod *Acartia tonsa**. *Mar. Environ. Res.* **181**. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105761>

Picone, M., Del Vecchio, S., Pirvu, M., Vecchiato, M., & Ghirardini, A. V. (2025). *Effects of ultraviolet filters oxybenzone (benzophenone-3) and 4-methylbenzylidene camphor on different life-history traits of the copepod *Acartia tonsa* Dana*. *Marine Pollution Bulletin*, **216**, 117952.

Rasdi, N.W. and Qin, J.G. (2016), *Improvement of copepod nutritional quality as live food for aquaculture: a review*. *Aquac Res*, **47**: 1-20. <https://doi.org/10.1111/are.12471>

Sanches M. S., Matteo Oliva, Lucia De Marchi, Alessia Cuccaro, Dario Puppi, Federica Chiellini, Rosa Freitas, Carlo Pretti, (2021), *Ecotoxicological screening of UV-filters using a battery of marine bioassays*, Environmental Pollution, Volume 290 ,118011,ISSN 0269-7491.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118011>

Sentenza del Tribunale del 22 novembre 2023 — *Symrise v ECHA* (Causa T-655/20), in GU C/2024/724 del 22.1.2024.

Soto, M., Rodríguez-Fuentes, G., (2014). *Evaluation of the estrogenic effects of UV filters on the sergeant major damselfish, *Abudefduf saxatilis**. Cienc. Mar. 40 (3), 187–196.
<https://doi.org/10.7773/cm.v40i3.2390>

Stien, D., Suzuki, M., Rodrigues, A.M.S. *et al.* (2020), *A unique approach to monitor stress in coral exposed to emerging pollutants*. Sci Rep **10**, 9601. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66117-3>

Svighuha, R., Fodor, I., Németh, Z. *et al.* (2025), *Short-term and long-term effects of microplastics and organic UV-filters on the invertebrate model species *Daphnia magna**. Environ Sci Pollut Res **32**, 4841–4855. <https://doi.org/10.1007/s11356-025-36008-z>

Thorel E., Clergeaud F., Jaugeon L., Rodrigues A.M.S., 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**, 5–7. (doi:10.3390/TOXICS8020029)

Thorel, E., Clergeaud, F., Rodrigues, A.M.S., Lebaron, P., Stein, D., (2022), *A comparative metabolomics approach demonstrates that octocrylene accumulates in *Stylophora pistillata* tissues as derivatives and that octocrylene exposure induces mitochondrial dysfunction and cell senescence*. Chem. Res. Toxicol. 35 (11), 2160–2167.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00248>

Van der Rhee H.J., E. de Vries, J.W. Coebergh, (2016), *Regular sun exposure benefits health*, Medical Hypotheses, Volume 97, Pages 34-37, ISSN 0306-9877,
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.10.011>.

Wheate, Nial., (2022), *A review of environmental contamination and potential health impacts on aquatic life from the active chemicals in sunscreen formulations*. Australian Journal of Chemistry. 75.. 241-248. <https://doi.org/10.1071/CH21236>

Wilke C., (2019), *Fundamentals of data visualization: a primer on making informative and compelling figures*, O'Reilly Media, Inc., Sebastopol, CA.
<https://clauswilke.com/dataviz/index.html>

Wollenberger L., (2005) *Toxicity tests with crustaceans for detecting sublethal effects of potential endocrine disrupting chemicals*, Ph.D Thesis, Environment&Resources, Technical University of Denmark.

Wong SW, Zhou GJ, Leung PT et al. (2020) *Sunscreens containing zinc oxide nanoparticles can trigger oxidative stress and toxicity to the marine copepod Tigriopus japonicus*. Mar Pollut Bull 154:111078. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111078>

Yang Y, Du L, Hosokawa M, Miyashita K.(2020), *Total Lipids Content, Lipid Class and Fatty Acid Composition of Ten Species of Microalgae*. J Oleo Sci. Oct 7;69(10):1181-1189. 10.5650/jos.ess20140. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32908099. <https://doi.org/10.5650/jos.ess20140>

Zulfiqar H., Maria Llompart, Ana Castiñeira-Landeira, Irene Coralli, Ivano Vassura, Daniele Fabbri, (2026), *Occurrence of twelve UV filters and evidence of cis-octinoxate formation in Adriatic coastal waters: Environmental implications*, Marine Pollution Bulletin, Volume 225, 2026, 119195, ISSN 0025-326X. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.119195>

SITOGRAFIA:

<https://www.marinespecies.org/index.php>

[Chiavi di ricerca: *Pavlova lutheri*; *Tetraselmis suecica*; *Tisochrysis lutea*]

(Consultato in data 29/01/2026)

[Chiave di ricerca: *Acartia tonsa*]

(Consultato in data 04/02/2026)

<https://guernseyseafarms.co.uk/index.html>

(Consultato in data 29/01/2026)

<https://copepodes.obs-banyuls.fr/en/fichesp.php?sp=13>

(Consultato in data 05/02/2026)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

[Chiavi di ricerca: Octocrylene]

[Chiavi di ricerca: 2-Ethylhexyl salicylate]

(Consultato in data 13/02/2026)

<https://www.handomchemicals.com/it/ensulizole-product/>

(Consultato in data 13/02/2026)

<https://chem.echa.europa.eu/>

[Chiavi di ricerca: Octocrylene]

[Chiavi di ricerca: 2-Ethylhexyl salicylate]

(Consultato in data 19/02/2026)

<https://www.msds-europe.com/it/indicazioni-di-pericolo-h/>

(Consultato in data 19/02/2026)

ALLEGATO I

a. Esempio quantitativi per la preparazione di un crema solare SPF +30

- Ceteareth-6 Stearyl Alcohol:** 3,00%
- Ceteareth-30:** 3,00%
- Glyceryl Stearate PEG 100 Stearate:** 2,00%
- C12-15 Alkyl Benzoate:** 10,00%
- Butyl Methoxydibenzoylmethane:** 5,00%
- Octocrylene:** 5,00%
- Ethylhexyl Salicylate:** 5,00%
- Ethylhexyl Methoxycinnamate:** 7,50%
- Hydrogenated Dimer Dilinoleyl / Dimethylcarbonate Copolymer:** 1,50%
- Lecithin, Tocopherol, Ascorbyl Palmitate, Citric Acid:** 0,05%
- Aqua:** q.b. a 100
- Tetrasodium EDTA:** 0,15%
- Propylen Glycol:** 2,00%
- Carbomer:** 0,30%
- Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer:** 0,30%
- Methylene Bis-benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol, Aqua, Decyl Glucoside, Propylene Glycol, Xanthan Gum:** 4,50%
- Cyclomethicone:** 1,00%
- Parfum:** q.b.
- Preservative:** q.b.
- Aloe barbadensis leaf juice:** 10,00%
- Polyacrylamide, C13-14 Isoparaffin, Laureth-7:** 7,00%
- Triethanolamine:** q.b. (per pH 6.0 - 6.5)

(Fonte: D'Agostinis, G., & Mignini, E. (2014). *Manuale del cosmetologo: le formule cosmetiche*. Tecniche Nuove).

b. Etichettatura e ingredienti di creme solari in commercio

Nell'etichetta dei prodotti sono presenti gli indicatori della capacità protettiva che sono i seguenti: SPF (Sunburn Protection Factor) che indica la protezione dai raggi UVB e PPD che indica la protezione dai raggi UVA.

In seguito sono elencati gli ingredienti di alcuni prodotti solari acquistabili al supermercato. In grassetto sono evidenziati i filtri solari.

CREMA SOLARE (1) PER BAMBINI, SPF = 50+

INGREDIENTI:

Aqua / Water, Alcohol Denat., **Ethylhexyl Salicylate**, **Ethylhexyl Triazone**, **Butyl Methoxydibenzoylmethane**, **Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine**, Isopropyl Palmitate, Diisopropyl Adipate, Glycerin, Propanediol, **Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid**, Dicaprylyl Ether, Triethanolamine, C12-22 Alkyl Acrylate/Hydroxyethylacrylate Copolymer, Tocopherol, Hydroxyacetophenone, Sodium Polyacrylate, Sodium Benzoate, Trisodium Ethylenediamine Disuccinate, **Drometrizole Trisiloxane**, Aloe Barbadensis Leaf Juice, Caprylyl Glycol, Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Citric Acid, Potassium Sorbate.

CREMA SOLARE (2) PER BAMBINI, SPF = 50+

INGREDIENTI:

Aqua, **Octocrylene**, C12-15 Alkyl Benzoate, Propylene Glycol, **Ethylhexyl Salicylate**, **Butyl Methoxydibenzoylmethane**, **Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine**, Dibutyl Adipate, Glycerin, **Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid**, **Ethylhexyl Triazone**, Microcrystalline Cellulose, Potassium Cetyl Phosphate, Hydrolyzed Jojoba Esters, Sodium Stearoyl Glutamate, Hydrogenated Palm Glycerides, Hydroxyacetophenone, Cellulose Gum, Jojoba Esters, Tocopheryl Acetate, Ethylhexylglycerin, Sodium Gluconate, Carnosine, Sodium Hydroxide, Phenoxyethanol.

Da notare che sulla confezione CREMA SOLARE (2) l'etichetta riporta "OCEAN FRIENDLY-SIN OCTINOXATE NI OXYBENZONE".

CREMA SOLARE (3) ADULTI, SPF = 50+

INGREDIENTI:

Aqua (Water), **Homosalate**, **Octocrylene**, Alcohol Denat., **Butyl Methoxydibenzoylmethane**, **Ethylhexyl Salicylate**, **4-Methylbenzylidene Camphor**, Cocoglycerides, Dibutyl Adipate, Glycerin, **Titanium Dioxide (filtro inorganico)**, Magnesium Aluminum Silicate, PEG-100 Stearate, Glyceryl Stearate, Phenoxyethanol, Acrylates Copolymer, Triacontanyl PVP, Polyglyceryl-2 Caprate, Caprylyl Glycol, Sucrose Stearate, Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed Oil, Stearic Acid, Alumina, Xanthan Gum, Glyceryl Caprylate, Squalane, Tocopherol Phosphate Dipotassium Salt, Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil, Ascorbyl Palmitate, Tocopheryl Acetate, Disodium EDTA, Triethanolamine, Parfum (Fragrance), Alpha-Isomethyl Ionone, Benzyl Salicylate, Butylphenyl Methylpropional, Cinnamyl Alcohol, Citronellol, Coumarin, Geraniol, Hydroxycitronellal, Linalool, BHT.