Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale

in Scienze ambientali

Curriculum "Capitale naturale e servizi ecosistemici"

Tesi di Laurea Magistrale

Effetti del filtro UV benzofenone-3 (ossibenzone) su diversi tratti del ciclo vitale del copepode *Acartia tonsa* (Dana, 1849)

Relatore:
Prof. Marco Picone

Laureanda:
Maria Pirvu
Matricola 870769

Anno accademico
2022/2023

Sommario

Abstract 6
1. **Introduzione** 7
1.1 **I filtri UV** 7
1.1.1 Tipologie di filtri UV 7
1.1.2 Modalità di immissione e presenza dei filtri UV in ambiente 10
1.1.3 Destino ambientale e tossicità dei filtri UV 12
1.2 **Benzofenone-3** 15
1.2.1 Descrizione chimica 16
1.2.2 Effetti ecotossicologici di BP-3 17
1.3 **I copepodi come modello biologico nei saggi di ecotossicità** 22
1.3.1 La specie indicatrice: *Acartia tonsa* (Dana, 1849) 24
1.3.2 Distribuzione geografica e principali tratti ecologici 26
1.3.3 L'impiego di *Acartia tonsa* in ecotossicologia 27
2. **Materiali e metodi** 30
2.1 **Mantenimento colture di *A. tonsa*** 30
2.2 **I test di tossicità** 32
2.2.1 Preparazione delle soluzioni di BP-3 32
2.2.2 Test di sviluppo larvale o LDR 33
2.2.3 Test di produzione uova e pellet 35
2.2.4 Test cronico 37
2.3 **Controllo di qualità e analisi statistica** 39
3. **Risultati** 40
3.1 Test di sviluppo larvale 40
3.2 Test di produzione uova e pellet 42
3.3 Test cronico 46
4. **Discussione dei dati** 51
4.1 Test di sviluppo larvale 51
4.2 Test di produzione uova e pellet 51
4.3 Test cronico 52
4.4 Sensibilità di *A. tonsa* rispetto ad altri invertebrati 56
5. **Conclusione** 60
Bibliografia 62
Sitografia 73

ALLEGATI 74
ALLEGATO A 75
ALLEGATO B 76
ALLEGATO C 78
ALLEGATO D 80
ALLEGATO E 81
ALLEGATO F 82
ALLEGATO G 83

Indice delle figure

Fig. 1 – Struttura chimica di BP-3 (Ramos et al., 2015) ……...pag. 16

Fig. 2 – Femmina di *Acartia tonsa* (Dana, 1849) (Fonte: recifathome.com)…….....pag. 23

Fig. 3 – Visione laterale di un copepode calanoide (Wootton & Castellani, 2017)……....pag. 24

Fig. 4 – Maschio (a sx) e femmina (a dx) di *Acartia tonsa* (Fonte: diark.org)...……pag. 24

Fig. 5 – Ciclo vitale di un copepode calanoide come *A.tonsa* (Wootton & Castellani, 2017)...pag. 25

Fig. 6 – Nauplio (in alto) e copepodite (in basso) dopo la fissazione con Lugol, osservati sul filtro allo stereomicroscopio (Foto: Maria Pirvu)……pag. 34

Fig. 7 – Rotatory mixer (VELP Scientifica) (Fonte: velp.com)……pag. 36

Fig. 8 – Risultati del test LDR: tasso di schiusa H (in alto), tassi di sopravvivenza ELSs (in mezzo), tasso di sviluppo larvale LDR (in basso). Le barre di errore rappresentano l'errore standard……pag. 41

Fig. 9 – Produzione giornaliera di uova nei giorni 11, 12, 13 e 14 per i cinque trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard……...pag. 42

Fig. 10 – Produzione giornaliera di pellet nei giorni 11, 12, 13 e 14 per i cinque trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard……...pag. 43

Fig. 11 – Produzione media di uova dal giorno 11 al giorno 14, per i cinque trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard……...pag. 44

Fig. 12 – Produzione media di pellet dal giorno 11 al giorno 14, per i cinque trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard……...pag. 44

Fig. 13 – Correlazione tra il numero di uova e il numero di pellet prodotti durante i quattro giorni di osservazione……pag. 45

Fig. 14 – Produzione giornaliera di uova nei giorni 20, 21 e 22 per i quattro trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard……...pag. 46

Fig. 15 – Produzione giornaliera di pellet nei giorni 20, 21 e 22 per i quattro trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard……...pag. 47

Fig. 16 – Produzione media di uova dal giorno 20 al giorno 22, per i quattro trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard e l'asterisco indica il trattamento significativamente differente a seguito di ANOVA a una via e test di Tukey ($p < 0.05$)……pag. 48

Fig. 17 – Produzione media di uova dal giorno 20 al giorno 22, per i quattro trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard……..pag. 48

Fig. 18 – Risultati del test LDR su generazione F_1: tasso di schiusa H (in alto), tassi di sopravvivenza ELSs (in mezzo), tasso di sviluppo larvale LDR (in basso). Le barre di errore rappresentano l'errore standard e gli asterischi indicano i trattamenti significativamente differenti a seguito di ANOVA a una via e test di Tukey ($p < 0.05$)……...pag. 50

Fig. 19 – Distribuzione cumulativa percentuale degli endpoint studiati nei coralli per i filtri UV……..pag. 57

Indice delle tabelle

Tab. 1 – Nome INCI, IUPAC, formula chimica e N°CAS di BP-3, peso molecolare (PM), coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($LogK_{ow}$) a 40°C, Solubilità in acqua a 25°C……..pag. 16

Tab. 2 – Valori di produzione di uova e pellet nei quattro giorni di osservazione, riportati come media ± errore standard…….pag. 43

Tab. 3 – Valori di produzione di uova e pellet nei tre giorni di osservazione, riportati come media ± errore standard……..pag. 47

Tab. 4 – Tabella di riepilogo dei dati di tossicità di BP-3 rilevati in altri crostacei……...pag. 59

Acronimi

PCP	Prodotti per la cura personale
BP-3	Benzofenone-3
EHMC	Etilesil metossicinammato
OCT	Octocrilene
EHS	Etilesil salicilato
4-MBC	4-metilbenzilidene canfora
SCCS	Comitato Scientifico per la Sicurezza dei Consumatori
ECHA	*Eurpean Chemicals Agency*
ISO	*International Organization for Standardization*
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
DOM	Materia organica disciolta
CAT	Catalasi
SOD	Superossido dismutasi
GST	Glutatione-s-transferasi
LDR	*Larval Development Ratio*
ELS	*Early life stages*

Abstract

Negli ultimi anni, il crescente utilizzo di filtri UV nella formulazione di prodotti per la cura personale (PCPs) per prevenire i danni alla pelle dovuti alla radiazione ultravioletta, ha portato ad un vasto rilascio di tali composti in ambiente, attirando l'attenzione sui possibili impatti che la loro ampia diffusione può recare su organismi ed ecosistemi. Numerosi studi hanno evidenziato gli effetti negativi dei filtri UV verso delicati ecosistemi marini come le barriere coralline, tanto che diversi Paesi hanno implementato divieti sulla vendita e sull'utilizzo di prodotti contenenti alcuni filtri UV, tra cui il benzofenone-3 (BP-3 o ossibenzone), uno dei filtri UV organici più utilizzati e frequentemente rinvenuto nelle acque costiere. A fronte della vasta produzione scientifica che ha indagato gli effetti ecotossicologici di BP-3 derivanti da un'esposizione acuta, nel presente lavoro sono stati condotti tre saggi con il copepode calanoide *Acartia tonsa* (Dana, 1849), con lo scopo di valutare gli effetti sub-cronici e cronici di BP-3 su diversi tratti del ciclo di vitale della specie a seguito di un'esposizione ad un range di concentrazioni che può essere rinvenuto in ambiente e di cui si hanno informazioni per effetti tossici su altri organismi acquatici (0.1 – 1000 $\mu g\ L^{-1}$). I test effettuati hanno preso in considerazione diversi endpoint, quali i tassi di mortalità e di sviluppo larvale e la produzione giornaliera di uova e pellet dei giovani adulti per lo studio degli effetti sulla generazione F_0, e la capacità di sopravvivenza e sviluppo larvale delle uova prodotte dagli individui esposti nel test cronico, per valutare gli effetti sulla generazione F_1. Dai risultati ottenuti, si osserva che BP-3 non dà effetti sullo sviluppo larvale fino ad una concentrazione di 1000 $\mu g\ L^{-1}$ e non altera la produzione di uova fino a 100 $\mu g\ L^{-1}$. Invece, BP-3 ritarda in maniera significativa lo sviluppo larvale della generazione F_1 a concentrazioni di 0.1 $\mu g\ L^{-1}$, evidenziando così un possibile rischio ambientale in merito al sostentamento delle popolazioni di copepodi che, in quanto importanti componenti dello zooplancton marino, può avere ricadute negative sull'intera catena trofica.

1. Introduzione

1.1 I filtri UV

La necessità di proteggersi dai danni alla pelle dovuti a prolungate esposizione alla luce solare ha portato, con lo sviluppo dell'industria chimica del secolo scorso, alla sintesi di sostanze chimiche che potessero svolgere tale ruolo di "protezione": così, negli ultimi ottant'anni, i filtri UV sono diventati componenti fondamentali per prodotti destinati a preservare la salute della pelle.

I filtri UV possono essere dunque definiti come composti chimici di sintesi che interagiscono con la componente ultravioletta della luce solare (la radiazione UV-A con lunghezza d'onda tra 320 e 400 nm e la radiazione UV-B tra 280 e 320 nm) al fine di rifrangerla o assorbirla e impedire così che questa possa recare danni alla salute umana (Caloni et al., 2021; Salvador & Chisvert, 2005).

I filtri UV sono infatti importanti ingredienti dei prodotti per la cura personale (o PCPs, *Personal Care Products*), come creme solari, creme antietà, rossetti, shampoo, lozioni e profumi, inseriti per proteggere la pelle dai danni della radiazione ultravioletta (Cadena-Aizaga et al., 2020; Ramos et al., 2015). Tra questi sono soprattutto le creme solari i principali prodotti a cui viene associata la presenza di filtri UV (Sànchez-Quiles et al., 2020).

Tuttavia, i filtri UV non sono esclusivi solamente dell'industria cosmetica ma vengono utilizzati anche all'interno di prodotti industriali come vernici, imballaggi, prodotti tessili, plastiche e inchiostri di stampa, al fine di evitare la fotodegradazione dei polimeri e dei pigmenti e garantire l'integrità dei materiali (Cadena-Aizaga et al., 2020). In questo caso, tali composti assumono il nome di "stabilizzatori di luce UV", differenziandosi dai "filtri UV" propriamente detti per il fatto che questi ultimi possono essere inseriti all'interno di prodotti cosmetici e quindi sono autorizzati ad essere applicati direttamente sulla pelle. Nonostante questa distinzione attuata in base alla destinazione d'uso, mantengono concettualmente la stessa funzione di "protezione" dal degrado dei prodotti dalla luce solare (Carve et al., 2021; Kameda et al., 2011).

1.1.1 Tipologie di filtri UV

Esistono due principali categorie di filtri UV, suddivisi in base alla composizione chimica, i filtri UV inorganici e organici (Kim & Choi, 2014).

I filtri UV inorganici comprendono solamente due composti: il diossido di titanio (TiO_2) e l'ossido di zinco (ZnO). Questi filtri UV agiscono secondo due modalità: schermano la radiazione solare attraverso la rifrazione e dispersione della luce e assorbono la radiazione incidente emettendola poi sotto forma di calore: per questo risultano efficaci nella copertura di entrambe le radiazioni UV-A e UV-B, consentendo così una protezione ad ampio spettro (Caloni et al., 2021; Smijs & Pavel, 2011).

Inizialmente questi filtri UV venivano chiamati anche “fisici” a causa della natura fisica dei meccanismi di rifrazione e schermatura, contrapponendosi ai filtri UV organici, detti “chimici”. Ad oggi, tale distinzione viene superata in quanto è stato riconosciuto che gran parte dell’azione di schermatura è dovuta in realtà al loro funzionamento come semiconduttori in grado di assorbire la radiazione solare e dissipare poi come calore l’energia assorbita (Osterwalder et al., 2014).
I filtri UV inorganici sono caratterizzati da diverse forme e dimensioni: in particolare, possono presentarsi all’interno della composizione del prodotto in forma micrometrica o in forma nanometrica (Caloni et al., 2021). Quest’ultima è stata sviluppata a fronte della necessità di rendere la crema solare o il prodotto cosmetico trasparente una volta applicato sulla pelle, in quanto l’effetto opaco e bianco che si otteneva con la forma micrometrica rendeva l’applicazione del prodotto poco gradevole esteticamente (Serpone et al., 2007; Osterwalder et al., 2014).
Inoltre, un’importante caratteristica propria della forma nanometrica delle particelle di TiO_2 è il loro rivestimento con materiali inerti (come il diossido di silicio (SiO_2), l’allumina (Al_3O_2) o polimeri organici) che viene aggiunto per impedire che, a seguito della fotoeccitazione delle particelle con la luce solare, si formino specie reattive dell’ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) che possano recare danni alla pelle (Caloni et al., 2021; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2022).

I filtri UV organici, invece, comprendono un’ampia varietà di composti organici di sintesi, caratterizzati dalla presenza di una o più strutture aromatiche associate ad una catena laterale con diversi gruppi funzionali (ad es. carbonilico, carbossilico, solfonico) e/o gruppi idrofobici che ne determinano le caratteristiche chimico-fisiche (Chisvert & Salvador, 2007; Cadena-Aizaga et al., 2020). La loro azione avviene tramite l’assorbimento della radiazione solare: questa porta all’eccitazione delle molecole che, ritornando poi al loro stato fondamentale, dissipano l’energia assorbita sotto forma di calore (Caloni et al., 2021).
Complessivamente, si annoverano circa cinquanta filtri UV organici, raggruppati in undici famiglie in base alle loro principali proprietà chimico-fisiche e a loro volta possono essere ulteriormente suddivisi in filtri UV-A e UV-B a seconda del range di radiazione ultravioletta che attenuano (Ramos et al., 2015; Chisvert & Salvador, 2007).
Tra le famiglie di filtri UV organici maggiormente utilizzati si riscontrano i derivati dell’acido cinnamico, come l’etilesil metossicinammato (EHMC), i salicilati, tra cui l’etilesil salicilato (EHS), i benzofenoni, come il benzofenone-3 (BP-3 o ossibenzone), l’octocrilene (OCT) della famiglia dei crileni, i derivati benzoilici, tra cui il butil-metossidibenzoilmetano (avobenzone), e i derivati delle triazine (Caloni et al., 2021; Gago-Ferrero et al., 2012).

Per quanto riguarda le loro caratteristiche chimico-fisiche principali, le varie classi di filtri UV organici presentano una certa eterogeneità in termini di solubilità e lipofilicità, che si ripercuote nel loro eterogeneo comportamento in ambiente. Si distinguono infatti composti moderatamente solubili, come la maggior parte dei derivati del benzofenone, mentre altri composti, come le triazine e i crileni, non sono solubili (Ramos et al., 2015), suggerendo così informazioni sulla loro probabile distribuzione tra acqua e sedimento (Cadena-Aizaga et al., 2020).
Una caratteristica che invece generalmente accomuna i filtri UV organici è l'elevata lipofilicità, misurata attraverso la costante di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}) che indica l'affinità del composto a distribuirsi tra la fase acquosa e la componente lipidica. Infatti, ad eccezione di alcuni derivati del benzofenone e della canfora, la maggior parte dei filtri UV organici presentano un $\log K_{ow}$ maggiore di 4 e sono considerati quindi lipofilici (Ramos et al., 2015). Tale caratteristica diviene particolarmente importante nel valutare la tendenza dei filtri UV organici al bioaccumulo nei tessuti biologici e alla possibile biomagnificazione lungo la catena trofica.

Considerando che ciascun filtro possiede il proprio intervallo di assorbimento specifico (UV-A o UV-B), nella composizione dei prodotti cosmetici viene inserita generalmente una combinazione di filtri UV, in modo tale da garantire il più ampio spettro di protezione possibile. Infatti, non ci sono filtri UV che se usati singolarmente possano dare un sufficiente grado di protezione oppure possano soddisfare i requisiti per un fattore di protezione solare (SPF, *Sun Protection Factor*[1]) sufficientemente elevato (Serpone et al., 2007).
Inoltre, il possibile impiego dei filtri UV e la loro concentrazione massima consentita nei prodotti cosmetici sono soggetti a regolamentazioni differenti e specifiche per ogni paese (Stiefel & Schwack, 2014). Per quanto riguarda l'Unione Europea, il Regolamento 1223/2009 nell'Allegato VI definisce l'elenco dei filtri UV autorizzati assieme alle massime concentrazioni approvate (EC, 2009): attualmente vi sono compresi 29 filtri UV, di cui due inorganici, ciascuno caratterizzato da una concentrazione massima che può variare tra il 3 e il 15% per i filtri organici e può arrivare al 25% per i filtri inorganici (Miller et al., 2021; Cadena-Aizaga et al., 2022). Tale elenco è periodicamente oggetto di modifiche e revisioni che aggiornano le concentrazioni consentite cosicché rispecchino le nuove evidenze scientifiche sulla sicurezza delle sostanze per il consumatore.
Nell'Allegato A si riporta l'elenco dei filtri UV organici approvati dall'Unione Europea con il Regolamento 1223/2009 e le sue successive modifiche e integrazioni.

[1] *Sun Protection Factor* (SPF) è l'indicatore della protezione dalla radiazione solare che l'applicazione del prodotto dovrebbe garantire nell'impedire che si sviluppi un eritema a seguito di una prolungata esposizione al sole (Osterwalder et al., 2014). Si compone del rapporto tra la dose minima di esposizione che porta a sviluppare l'eritema (o MED, *Minimal Erythema Dose*) con l'applicazione della crema e la MED senza applicazione della crema (Stiefel & Schwack, 2014).

1.1.2 Modalità di immissione e presenza dei filtri UV in ambiente

Sono state individuate due principali modalità di immissione in ambiente di queste sostanze (Giokas et al., 2007): il rilascio diretto, attraverso fonti non puntuali come le attività ricreative nelle località balneari che porta al lavaggio dei filtri UV dalla pelle in acqua, e il rilascio indiretto, da fonti puntuali come gli scarichi degli impianti di trattamento delle acque reflue che non riescono a smaltirli completamente dai reflui domestici e industriali (Carve et al., 2021). Tra le fonti indirette si considera anche la deposizione atmosferica dovuta alle emissioni gassose degli impianti di trattamento e alla dispersione delle particelle di aerosol dei prodotti cosmetici in forma di spray (Sànchez-Quiles et al., 2020).

Per quanto riguarda il rilascio diretto, diversi studi hanno osservato una relazione diretta tra l'affluenza dei bagnanti e un aumento delle concentrazioni di filtri UV rinvenute in acqua (Sànchez-Quiles & Tovar-Sànchez, 2015), individuando non solamente un trend stagionale, con maggiori concentrazioni in estate piuttosto che in inverno (Fagervold et al., 2019), ma anche un trend giornaliero, in estate, con un picco in corrispondenza delle ore maggiormente frequentate per le attività ricreative in acqua (Tovar-Sànchez et al., 2013; Labille et al., 2020). Oltre all'andamento temporale, si può inoltre osservare una diversa distribuzione spaziale, con maggiori concentrazioni di filtri UV rinvenute lungo la costa rispetto al mare aperto e una maggiore presenza di filtri UV nello strato marino superficiale (SML, *Sea Surface Micro Layer*) rispetto alle acque profonde (Labille et al., 2020; Fagervold et al., 2019).
Nel tentativo di contestualizzare la rilevanza delle fonti di immissione, sono state proposte delle stime che esplicassero l'impatto del rilascio in acqua dei principi attivi delle creme solari. Nello studio di Danovaro et al. (2008) si è stimato che più del 25% della crema applicata sulla pelle viene lavata via durante le attività ricreative in acqua. Labille et al. (2020), invece, hanno calcolato che su un campione di 3000 bagnanti, che hanno applicato in totale una media di 52,5 kg di crema solare, risultano immessi in acqua una media di 15,7 kg. Questo richiama l'attenzione sui diversi impatti del turismo costiero, evidenziando una nuova criticità da non sottovalutare in merito alla salvaguardia degli ecosistemi marino-costieri (Caloni et al., 2021).

Parallelamente al rilascio diretto, la dispersione indiretta dei filtri UV tramite gli scarichi degli impianti di trattamento delle acque reflue risulta essere la fonte di impatto maggiore nella diffusione in ambiente di tali sostanze (Tsui et al., 2014). La capacità di rimozione dei filtri UV all'interno degli impianti risulta essere molto variabile a seconda dei tipi di trattamenti che vengono implementati, presentando però generalmente una bassa efficienza (Cuccaro et al., 2022).

Il percorso che i filtri UV seguono all'interno degli impianti di depurazione dipende prevalentemente dalle loro caratteristiche chimico-fisiche: infatti, è stato osservato che i composti maggiormente solubili, come i benzofenoni, si ritrovano frequentemente all'interno degli effluenti, mostrando una netta tendenza a rimanere associati alla matrice acquosa, mentre composti con una maggiore lipofilicità, come il 4-metilbenzilidene-canfora (4-MBC) o OCT, pur venendo rinvenuti anch'essi negli effluenti, a causa della maggiore affinità per il comparto solido tendono a restare associati ai fanghi (Ramos et al., 2016; Gago-Ferrero et al., 2013).
La mancata rimozione dei filtri UV dagli scarichi domestici ed industriali non solo si configura come fonte indiretta per la diffusione in ambiente ma anche come criticità relativa alla qualità dell'acqua potabile, in quanto diversi studi hanno evidenziato la loro presenza all'interno dell'acqua di rubinetto (Díaz-Cruz et al., 2012; Loraine & Pettigrove, 2006). Tale criticità risulta essere comune anche per altri contaminanti emergenti (ad es. principi attivi farmaceutici), evidenziando così la necessità di migliorare l'efficienza dei processi depurativi.

Negli ultimi anni, l'utilizzo di prodotti per la protezione della pelle come le creme solari è notevolmente incrementato a seguito della crescente consapevolezza riguardo la loro efficacia nel prevenire danni alla pelle come eritemi, l'invecchiamento precoce e melanomi (Schneider & Lim, 2018). Questo ha portato ad un aumento del rilascio in ambiente dei filtri UV, che si sono così diffusi a livello globale (Sànchez-Quiles et al., 2020; Vecchiato et al., 2021). La loro presenza è stata rinvenuta all'interno di diverse matrici ambientali: sono stati riscontrati all'interno di acque superficiali come le acque marine, le acque di laghi e fiumi e nelle acque sotterranee, nonché in suoli e sedimenti (Juliano & Magrini, 2017). Le concentrazioni ambientali nelle acque sono altamente variabili, tanto da distribuirsi in un intervallo tra i ng L^{-1} e mg L^{-1} e dipendono dalla località geografica, dal periodo temporale e dalla matrice analizzata (Carve et al., 2021).
Inoltre, i filtri UV sono stati rilevati anche nei tessuti biologici: infatti, l'evidenza di situazioni di bioaccumulo in organismi acquatici e di effetti negativi verso ecosistemi marini, come le barriere coralline (Cadena-Aizaga et al., 2020; Montes-Grajales et al., 2017), ha contribuito a identificare i filtri UV come contaminanti emergenti e a stimolare la ricerca scientifica verso indagini più accurate relativamente al loro destino ambientale, in termini sia di reattività e degradazione nei comparti abiotici sia di tossicità verso il comparto biotico.

1.1.3 Destino ambientale e tossicità dei filtri UV

Il comportamento dei filtri UV nelle diverse matrici ambientali viene determinato sia dalle caratteristiche chimico-fisiche degli stessi sia dalle condizioni ambientali di contorno, che influenzano le loro interazioni con gli organismi.

In particolare, nel comparto acquatico, i filtri UV caratterizzati da una maggiore lipofilicità possono presentare una maggiore tendenza ad essere adsorbiti sulle particelle di materiale organico particolato e conseguentemente depositarsi sul fondo, accumulandosi così nel sedimento. Questo aspetto può risultare particolarmente critico per le comunità di organismi bentonici per via degli effetti tossici che possono presentarsi e offrire nuovi spunti di ricerca per lo studio dei prodotti di biodegradazione da parte delle comunità microbiche (Volpe et al., 2017; Fagervold et al., 2019). Altrimenti i filtri UV possono rimanere concentrati nelle acque superficiali ed andare incontro a fotodegradazione oppure risultare biodisponibili all'accumulo negli organismi (Sànchez-Quiles et al., 2020).

Nel contesto dei possibili processi di degradazione dei filtri UV, la stabilità delle molecole è un requisito caratteristico di questi composti affinché garantiscano un'adeguata protezione dalla radiazione ultravioletta. Tuttavia, proprio a causa del loro specifico meccanismo di interazione con la luce solare, alcuni filtri UV possono essere suscettibili a reazioni di fotodegradazione che, se avvengono direttamente sulla pelle con l'applicazione del prodotto, possono provocare allergie e dermatiti e causare dunque danni alla pelle (Gilbert et al., 2013).

Anche nei comparti ambientali, come nelle acque superficiali, i filtri UV possono presentare una certa reattività in base alla loro fotostabilità: infatti, la radiazione solare può instaurare una serie di reazioni fotochimiche che portano alla degradazione dei composti originari in frammenti reattivi, come i radicali liberi, o in intermedi reattivi (Díaz-Cruz et al., 2008). Tra queste si annoverano principalmente reazioni di fotolisi, che possono essere dirette oppure indirette, nel caso in cui la trasformazione avvenga in presenza di un fotosensibilizzatore come la materia organica disciolta (o DOM) (Sànchez-Quiles & Tovar-Sànchez, 2015).

L'interesse ambientale per queste reazioni è legato alla produzione di specie reattive dell'ossigeno, che deriva dai processi di fotodegradazione: tali specie, come il radicale idrossile (OH•), l'anione superossido (O_2^{-}•) e il perossido d'idrogeno (H_2O_2), possono causare stress ossidativo negli organismi acquatici, danneggiando lipidi, proteine ed altre biomolecole (Sànchez-Quiles & Tovar-Sànchez, 2015; Caloni et al., 2021).

La produzione di ROS è comune ad entrambe le tipologie di filtri UV, sia organici sia inorganici (Caloni et al., 2021). Inoltre, è stato osservato che la presenza combinata di più filtri UV nelle matrici acquose influenza i fenomeni fotochimici, in quanto si verificano sinergie tra le reazioni di

fotodegradazione, mostrando così una maggiore tossicità rispetto al singolo filtro UV. Questo aspetto risulta importante nelle analisi ambientali, poiché tali sostanze sono sempre presenti in miscele all'interno dei prodotti attraverso cui vengono rilasciate (Díaz-Cruz et al., 2008).

È stato inoltre osservato che, a causa della loro elevata lipofilicità, alcuni filtri UV tendono a bioaccumulare nel biota e, vista la natura delle modalità di immissione, l'attenzione è stata focalizzata prevalentemente sulle componenti biotiche dei comparti acquatici (Gago-Ferrero et al., 2012).
Diversi studi hanno rilevato la presenza di filtri UV nei tessuti di pesci, crostacei e molluschi, provenienti non solo da zone marino-costiere ma anche da laghi, fiumi e aziende di acquacoltura (Langford et al., 2015; Fent et al., 2010; Cunha et al., 2018). Lo studio dei fenomeni di bioaccumulo si dimostra quindi indicativo dell'effettiva diffusione dei filtri UV a livello globale e solleva nuovi interrogativi anche sui rischi relativi alla salute umana (Lozano et al., 2020).
I filtri UV sono stati inoltre rinvenuti nei tessuti e nei gusci delle uova di uccelli acquatici e rapaci (Fent et al., 2010; González-Rubio et al., 2020; Molins-Delgado et al., 2017) evidenziando la potenzialità di tali sostanze di dar luogo a fenomeni di biomagnificazione lungo le reti trofiche.

Tuttavia, uno dei principali effetti tossici attribuiti ai filtri UV è la loro azione di *endocrine disruptors* o interferenti endocrini, in quanto risultano capaci di interferire con la sintesi e il metabolismo degli ormoni endogeni e quindi con la regolazione delle naturali funzioni biologiche degli organismi (Carve et al., 2021). Date le caratteristiche chimiche delle molecole, alcuni filtri UV, come i derivati dei benzofenoni e della canfora, presentano attività estrogenica e/o antiandrogenica, mimando o opponendosi all'azione degli ormoni naturali oppure legandosi ai recettori ormonali, inibendone la funzionalità (Carve et al., 2021). Tra i vari effetti riscontrati, è stata osservata l'induzione della produzione di vitellogenina nei pesci maschi (*Danio rerio* Hamilton, 1822), aspetto che può generare effetti negativi sulla riproduzione (Kinnberg et al., 2015).

Altri effetti tossici dei filtri UV riguardano la neurotossicità. In particolare, è stato osservato che negli embrioni di pesci (*D. rerio*) e di ricci di mare (*Paracentrotus lividus* Lamark, 1816) composti come il 4-MBC e EHMC possono alterare l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE), impedendo la corretta trasmissione degli impulsi nervosi (Li et al., 2016; Carve et al., 2021). Inoltre, l'esposizione ai filtri UV può indurre l'alterazione nell'attività di enzimi antiossidanti, quali catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD) e glutatione-s-tranferasi (GST) evidenziando così una situazione di stress ossidativo (Carve et al., 2021). La varietà degli effetti tossici può assumere ancora più ampie sfumature, considerando la diversa influenza che la variabilità delle condizioni ambientali può avere sull'interazione tra il composto e l'organismo. Ad esempio, temperatura e salinità influenzano,

solitamente aumentando, la tossicità dei filtri UV per gli organismi studiati (Kusk et al., 2011; Hong et al., 2021).

Infine, particolare attenzione è stata riservata agli effetti tossici che i filtri UV producono sui coralli. Uno studio di Danovaro et al. (2008) ha evidenziato come la presenza di filtri UV nell'acqua di mare fosse correlato ad un aumento delle infezioni virali nei coralli, provocato dall'induzione del ciclo litico virale nelle zooxantelle con infezioni latenti: è stato così osservato che tale effetto porta allo sbiancamento del corallo. Sono stati inoltre identificati anche altri effetti provocati dalla presenza dei filtri UV, come stress ossidativo, genotossicità ed *endocrine disruption* per le planule dei coralli (Downs et al., 2016).

A fronte delle numerose evidenze scientifiche riguardo gli effetti negativi su organismi ed ecosistemi marini, alcuni paesi hanno deciso di attuare divieti e bandi relativi all'utilizzo di creme solari contenenti specifici filtri UV. Nel 2018, lo stato delle Hawaii (USA) ha approvato una legge che impone il divieto di vendita e utilizzo di creme solari contenenti BP-3 e EHMC, entrata in vigore nel gennaio 2021. Successivamente la città di Key West in Florida (USA), le Isole Marianne Settentrionali e l'isola caraibica Bonaire hanno implementato lo stesso divieto, seguite dalle Isole Vergini Americane, che ai precedenti due filtri UV aggiunge il bando anche per OCT (Narla & Lim, 2020; Khanna & Singh, 2023; Ouchene et al., 2019).
Inoltre, a partire da gennaio 2020, la Repubblica di Palau vieta la vendita e/o il consumo di creme solari contenenti BP-3, EHMC, OCT e 4-MBC e nel luglio dello stesso anno anche il Governo di Aruba vieta l'importazione e l'uso di creme contenenti BP-3. Anche alcune aree di riserve naturali in Messico e in Thailandia hanno imposto simili divieti (Miller et al., 2021; Khanna & Singh, 2023).

Invece, per quanto riguarda l'Unione Europea, nel 2015 è stata istituita la *Surface Water Watch List*, un elenco di sostanze chimiche che solitamente non vengono monitorate in ambiente, tra cui alcuni pesticidi, erbicidi e principi attivi farmaceutici, con lo scopo di acquisire informazioni sulla loro diffusione e suoi loro eventuali impatti ambientali. Tale lista viene periodicamente aggiornata, togliendo alcuni dei composti monitorati e aggiungendone di nuovi da monitorare. Anche alcuni filtri UV sono entrati nella lista: nel 2015 era stato inserito EHMC, poi tolto nel successivo aggiornamento del 2018, mentre nell'ultimo aggiornamento del 2022, sono stati inseriti tre filtri UV: avobenzone, OCT e BP-3 (EC, 2022b).

1.2 Benzofenone-3

Il benzofenone 3 (BP-3 o ossibenzone) è un filtro UV organico appartenente alla famiglia dei benzofenoni ed è uno dei principali filtri UV utilizzati nelle creme solari e in altri prodotti per la cura personale, oltre ad essere utilizzato come stabilizzatore UV in imballaggi e rivestimenti in plastica (Kim & Choi, 2014). Sintetizzato per la prima volta nel 1906, BP-3 è stato inserito come filtro UV nelle creme solari dagli anni '80 del secolo scorso, quando la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) ne ha approvato l'utilizzo (Mustieles et al., 2023).

Attualmente, l'impiego di BP-3 nei prodotti cosmetici è diversamente regolamentato a livello internazionale ed in alcuni paesi è stato addirittura bandito, come già precedentemente accennato.

Per quanto riguarda la normativa europea, BP-3 è inserito nell'Allegato VI del Regolamento 1223/2009 tra i filtri UV autorizzati nei prodotti cosmetici ed è uno di quei composti per cui la concentrazione massima consentita è stata modificata negli anni, a fronte delle nuove valutazioni sulla sicurezza per consumatori.

Inizialmente BP-3 è stato autorizzato ad una concentrazione massima pari al 10% del prodotto finale, scesa con il Regolamento 2017/238 al 6%. Successivamente, tale concentrazione è stata ulteriormente abbassata con il Regolamento 2022/1176 portandola al 2,2% per tutti i prodotti cosmetici per il corpo, mantenendo però la concentrazione di 6% nei prodotti per il viso e per le labbra (EC, 2022). Quest'ultima modifica, in particolare, ha accolto il parere del Comitato Scientifico per la Sicurezza dei Consumatori (*Scientific Committee on Consumer Safety*, SCCS), sollecitato in merito alle preoccupazioni per la possibile azione di BP-3 come interferente endocrino e pubblicato nel marzo 2021 con le nuove indicazioni sulle concentrazioni ritenute sicure per i consumatori (SCCS, 2021).

Secondo l'ECHA (*European Chemicals Agency*), nell'Unione Europea la produzione e l'importazione di BP-3 si aggira tra le 100 e le 1000 tonnellate l'anno, che vengono utilizzate nella formulazione dei cosmetici e in diversi prodotti industriali come rivestimenti in plastica, imballaggi per alimenti, materiali da costruzione e per il mobilio per impedirne la fotodegradazione (ECHA, 2023a). BP-3 è registrato ai sensi del Regolamento REACH come altamente tossico per gli organismi acquatici e tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Inoltre, è attualmente sotto valutazione come interferente endocrino, essendo stato inserito nella lista Community Rolling Action Plan (CoRAP) che include le sostanze ritenute potenzialmente pericolose per la salute umana e l'ambiente (ECHA, 2023a).

1.2.1 Descrizione chimica

I benzofenoni sono una famiglia di composti organici caratterizzati dalla struttura di base del benzofenone (BP), formata due anelli benzenici uniti da un gruppo carbonilico (Ramos et al., 2015), a cui possono essere aggiunti sostituenti in diverse posizioni degli anelli benzenici.

BP-3, in particolare, presenta su uno dei due anelli due sostituenti in posizione 2 e 4, rispettivamente un gruppo idrossile (-OH) e un gruppo metossile ($-OCH_3$) (Fig.1).

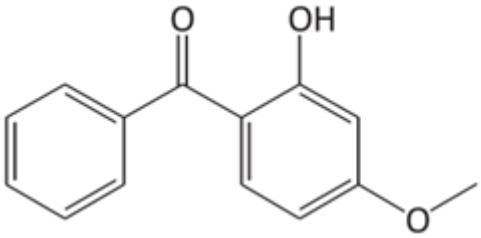


Fig. 1 – Struttura chimica di BP-3 (Fonte: Ramos et al., 2015)

La presenza di tali gruppi elettron-donatori in posizione *orto* e *para* consente alla molecola di assorbire sia la radiazione UV-A sia UV-B, avendo un picco di assorbimento massimo (λ_{max}) rispettivamente a 286 e 324 nm. Tale caratteristica rende BP-3 un filtro UV ad ampio spettro (Cuccaro et al., 2022).

Il numero e la posizione dei sostituenti sono inoltre importanti per contestualizzare la tossicità dei vari benzofenoni, in quanto è stato osservato che composti che presentano un gruppo -OH in posizione tre o quattro dimostrano una maggiore attività estrogenica rispetto ad altri (Carve et al., 2021).

Per quanto riguarda le caratteristiche chimico-fisiche di BP-3, in letteratura si riscontrano diverse stime per solubilità e coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($logK_{ow}$) che variano a seconda delle condizioni di stima o di misurazione, in mancanza di metodologie standardizzate a livello internazionale (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2022). Inoltre, tali stime o misurazioni sono solitamente effettuate su campioni di acqua dolce, tralasciando così l'effetto che la salinità può avere sul comportamento del composto chimico in acqua di mare (Mitchelmore et al., 2021). In Tab.1 è stato scelto di riportare i valori delle caratteristiche chimico-fisiche di BP-3 forniti dall'ECHA.

Nome INCI	Nomenclatura IUPAC	Formula	N° CAS	PM ($g\ mol^{-1}$)	Log K_{ow}	Solubilità ($mg\ L^{-1}$)
Benzophenone-3 / Oxybenzone	(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-phenylmethanone	$C_{14}H_{12}O_3$	131-57-7	228,24	3,45	6

Tab. 1 – Nome INCI, IUPAC, formula chimica e N°CAS di BP-3, peso molecolare (PM), coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($LogK_{ow}$) a 40°C, Solubilità in acqua a 25°C – dati ottenuti da https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/5515/5/2/1 (ECHA, 2023b) il 07/09/23

Come altri benzofenoni, BP-3 risulta essere moderatamente solubile in acqua e, presentando un $logK_{ow}$ tendente a 4, viene considerato un composto lipofilico (Ramos et al., 2015). Inoltre, BP-3 è fotostabile e persistente negli ambienti acquatici: in condizioni estive, nelle acque superficiali, BP-3 presenta un periodo di emivita di diverse settimane, che può aumentare da sette a nove volte nel periodo invernale, e risultare ancora maggiore con l'aumento della profondità e con la presenza di carbonio organico disciolto (DOC) (Vione et al., 2013).
BP-3 è comunque soggetto a fotodegradazione tramite fotolisi diretta e reazioni con radicali OH• e DOM che portano alla produzione di intermedi di trasformazione, tra cui l'acido benzoico e la benzaldeide (Vione et al., 2013). Inoltre, BP-3 è uno dei filtri UV più frequentemente rinvenuti in ambiente, soprattutto nelle matrici acquose, e presenta una notevole variabilità nelle concentrazioni rilevate, con un range compreso tra i ng L^{-1} e mg L^{-1} (Cadena-Aizaga et al., 2020).

1.2.2 Effetti ecotossicologici di BP-3

Negli ultimi anni, diversi aspetti hanno messo in discussione la sicurezza di BP-3 come filtro UV nelle creme solari, tra cui la tendenza a provocare irritazioni e dermatiti fotoallergiche da contatto (Gilbert et al., 2013). Inoltre, BP-3 è stato frequentemente rilevato in campioni di urina a seguito dell'applicazione di creme contenenti BP-3 (Calafat et al., 2008; Lassen et al., 2013): questo evidenzia la capacità di BP-3 di essere assorbito attraverso l'epitelio, grazie anche al carattere lipofilico e al basso peso molecolare (Gilbert et al., 2013), portando conseguentemente alla sua distribuzione all'interno dell'organismo, con potenziali effetti negativi su diversi organi e/o funzioni biologiche (Wnuk et al., 2022). BP-3 è stato rinvenuto anche nel plasma, nel latte materno e nel liquido amniotico, ponendo dubbi sull'effettiva sicurezza di tali prodotti per le donne in gravidanza e per i neonati (Wnuk et al., 2022; Mustieles et al., 2023).

Parallelamente agli studi nell'ambito della tossicologia umana, BP-3 ha sollevato un notevole interesse anche in merito ai suoi potenziali effetti negativi in ambiente, essendo stato tra i primi filtri UV ad essere riconosciuti come potenzialmente pericolosi per le barriere coralline (Danovaro et al., 2008). Infatti, sono stati rilevati molteplici meccanismi di tossicità di BP-3 verso i coralli: BP-3 risulta essere genotossico e può agire come interferente endocrino, portando all'ossificazione delle planule e compromettendone il naturale sviluppo. Inoltre, BP-3 può danneggiare le zooxantelle, inducendo stress ossidativo sulle membrane dei tilacoidi, e provocare così lo sbiancamento del corallo (Downs et al., 2016).
Per quanto sia necessario puntualizzare che tali effetti sono stati spesso osservati a seguito di un'esposizione ad elevate concentrazioni di BP-3 (nell'ordine di mg L^{-1}), bisogna ricordare che le

zone costiere in prossimità delle barriere coralline sono maggiormente esposte alla presenza di elevate concentrazioni di BP-3, in quanto affollate mete turistiche (Downs et al., 2016).
Infine, è stato osservato che BP-3 può bioaccumulare nei tessuti dei coralli, dove eventualmente può essere trasformato in metaboliti più tossici (He et al., 2019; Tsui et al., 2017).

Nonostante la moderata lipofilicità, diversi studi hanno evidenziato la capacità di BP-3 di bioaccumulare in organismi acquatici, come crostacei, molluschi e pesci (Vidal-Liñán et al., 2018; Langford et al., 2015). Infatti, BP-3 risulta essere uno tra i filtri UV più frequentemente rinvenuti nel biota, sebbene in concentrazioni spesso minori rispetto ad altri filtri UV maggiormente lipofilici (Ramos et al., 2015).
I dati relativi al bioaccumulo devono essere comunque contestualizzati anche in base alla capacità degli organismi di detossificare i contaminanti e non solamente ad un eventuale mancato uptake. Infatti, BP-3 è oggetto di processi di biotrasformazione di fase I e di fase II che portano alla formazione di metaboliti, non necessariamente meno tossici, e che comportano una diminuzione di concentrazione del composto parentale nei tessuti (Kim & Choi, 2014; Vione et al., 2013). Tra le reazioni di fase I, atte a rendere il composto maggiormente idrofilico, si osserva la dealchilazione del gruppo metossile che porta alla formazione di benzofenone-1 (2,4-diidrossi-benzofenone o BP-1), il principale metabolita di BP-3. Secondariamente, reazioni di idrossilazione aromatica producono altri metaboliti, tra cui il benzofenone-8 (2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone o BP-8) e 2,3,4-trihydroxybenzophenone (o THB) (Díaz-Cruz et al., 2008).
Invece, con il metabolismo di fase II vengono prodotti i coniugati glucuronici di BP-3 e dei suoi metaboliti di fase I: tali coniugati, caratterizzati da una maggiore solubilità rispetto ai composti di partenza, vengono poi escreti con l'urina, che viene considerata la principale via di eliminazione di BP-3 dall'organismo (Calafat et al., 2008).
Gli studi sulla tossicocinetica di BP-3 si sono concentrati prevalentemente sui roditori e sull'uomo, tuttavia i metaboliti BP-1 e coniugati glucuronici di BP-3 sono stati rilevati anche nei pesci, suggerendo la presenza di processi metabolici comuni anche ad altri gruppi del regno animale (Blüthgen et al., 2012; Ziarrusta et al., 2018; Molins-Delgado et al., 2018). Nei coralli sono stati invece individuati come metaboliti BP-1, BP-8 e coniugati glucosidici di BP-3, questi ultimi rinvenuti precedentemente solo nelle piante, che risultano essere più tossici rispetto al composto parentale (Vuckovic et al., 2020; He et al., 2019).
La tendenza al bioaccumulo di BP-3 può essere dunque notevolmente variabile a seconda sia delle concentrazioni presenti in ambiente sia della capacità intrinseca dell'organismo di bioaccumulare, al

netto dei processi di biotrasformazione che, ove possibile, è preferibile tenere in considerazione nei monitoraggi e negli studi sul bioaccumulo (Ziarrusta et al., 2018).

Tra i principali effetti tossici riscontrati per BP-3, uno dei più rilevanti risulta essere la sua potenziale azione di interferente endocrino, con conseguenti ripercussioni sullo sviluppo e sulla capacità riproduttiva degli organismi (Carve et al., 2021). Numerosi studi effettuati sui roditori hanno infatti riportato effetti estrogenici e antiandrogenici, oltre a interferenze con l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (HPT-axis) (Wnuk et al., 2022; Mustieles et al., 2023).
In uno studio condotto su *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (trota iridea) e *Oryzias latipes* (Temminick & Schlegel, 1846) (pesce del riso), l'esposizione a BP-3 causa l'induzione della vitellogenina negli individui maschi, fenomeno che può provocare la comparsa di caratteri sessuali primari femminili e compromettere così il successo riproduttivo, e nelle femmine porta ad una netta diminuzione nella produzione di uova e nel successo di schiusa (Coronado et al., 2008). Mentre in *Danio rerio* (pesce zebra), BP-3 mostra attività anti-androgenica (Blüthgen et al., 2012), comporta un ritardo nello sviluppo delle gonadi, induce la produzione di vitellogenina nei maschi (Kinnberg et al., 2015) e provoca effetti teratogenici, facendo diminuire il numero di uova schiuse (Balázs et al., 2016).
Per quanto riguarda gli invertebrati, alcuni studi condotti sul dittero *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) hanno osservato che BP-3 mima l'azione dell'ecdisone, l'ormone naturale coinvolto nella metamorfosi degli insetti, e può alterare lo sviluppo embrionale, ritardando il momento della schiusa delle uova (Ozáez et al., 2014). Inoltre, la prole risulta essere più sensibile agli effetti di BP-3 rispetto alla generazione parentale, soprattutto in termini di capacità di schiusa e sopravvivenza, il che può portare a ripercussioni negative a livello di popolazione (Campos et al., 2019).
Infine, effetti indiretti di *endocrine disruption* si possono manifestare come alterazioni comportamentali, che si palesano a seguito di cambiamenti ormonali dovuti all'esposizione di BP-3. Ad esempio, gli individui maschi di *Betta splendens* (Regan, 1910) (pesce combattente) esposti a BP-3 si sono mostrati meno aggressivi e meno inclini al corteggiamento rispetto al gruppo di controllo (Portrais et al., 2019; Chen et al., 2016). Inoltre, BP-3 può indurre una minore aggressività e socialità e alterare il ritmo circadiano in individui di *D. rerio* (Moreira & Luchiari, 2022; Kopp et al., 2017).
Lo studio di BP-3 come interferente endocrino risulta essere particolarmente importante, poiché gli effetti negativi che ne derivano hanno la particolarità di poter essere indotti anche a seguito di un'esposizione a basse concentrazioni di contaminante che possono essere comunemente rinvenute in ambiente (Portrais et al., 2019).

Un altro importante effetto tossico di BP-3 è legato alla produzione di stress ossidativo, studiato anche in merito agli eventuali danni alla pelle dovuti all'applicazione dei prodotti solari. Infatti, in uno studio effettuato *in vitro* su cellule umane dell'epidermide si è rilevato un significativo incremento nella produzione di ROS nelle cellule esposte al trattamento con BP-3 rispetto al controllo (Hanson et al., 2006). Situazioni di stress ossidativo sono state osservate anche in diversi organismi acquatici: nel mollusco *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854), nei pesci *D. rerio* e *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) (pesce rosso) e nella tartaruga marina *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), l'esposizione a BP-3 ha comportato un'alterazione dell'attività degli enzimi antiossidanti SOD, CAT e GST, utilizzati come biomarker a fronte della produzione di ROS, evidenziando così la potenziale capacità di BP-3 di generare stress ossidativo (Chaves Lopes et al., 2020; Moreira et al., 2023; Liu et al., 2015; Cocci et al., 2020).
Tra gli altri effetti riscontrati, BP-3 si è rivelato essere neurotossico, genotossico e mutageno nei pesci (Moreira et al., 2023; Almeida et al., 2019), in cui si è anche osservata l'induzione dell'attività del citocromo P450, famiglia di enzimi coinvolti nella detossificazione degli xenobiotici, confermando la capacità dell'organismo di metabolizzare il filtro UV (Blüthgen et al., 2012).
Infine, alcuni studi hanno indagato la potenziale tossicità di BP-3 verso le microalghe, che hanno manifestato una notevole sensibilità anche a concentrazioni facilmente rinvenute in ambiente (nell'ordine di $\mu g\ L^{-1}$): l'effetto tossico si manifesta solitamente con una riduzione dell'attività metabolica e del tasso di crescita (Paredes et al., 2014; Thorel et al., 2020), dovuta probabilmente ad una inibizione della sintesi dei pigmenti fotosintetici (Mao et al., 2017; Scheele et al., 2023).

Dunque, l'ampia diffusione di BP-3 in diverse matrici ambientali e i primi riscontri sui suoi effetti tossici hanno sollecitato la comunità scientifica ad approfondire i vari aspetti negativi di BP-3 in ambiente: sono stati così condotti numerosi studi che hanno indagato le conseguenze dell'esposizione a BP-3 su diversi organismi test appartenenti a diversi livelli della catena trofica, nel tentativo di comporre un quadro generale sugli effetti ecologici del filtro UV.
Tuttavia, in quanto contaminante emergente, le incognite relative al comportamento di BP-3 in ambiente e verso gli organismi viventi, hanno imposto un approccio di screening che contestualizzasse innanzitutto la tipologia e l'entità dell'effetto: per questo la maggior parte degli studi effettuati ha adottato un design sperimentale più incentrato sull'indagine degli effetti acuti piuttosto che sulle conseguenze di un'esposizione cronica.
Di conseguenza, la rilevanza ambientale di alcuni effetti tossici può essere messa in discussione poiché questi sono stati osservati a seguito di un'esposizione acuta, con concentrazioni elevate in un breve intervallo di tempo, condizione meno frequentemente rinvenuta in ambiente (Wheate, 2022).

Si pone quindi la necessità di indagare più approfonditamente la natura degli effetti cronici che possono sorgere con un'esposizione a basse concentrazioni per un prolungato periodo di tempo, sempre tenendo in considerazione le conoscenze acquisite precedentemente.

1.3 I copepodi come modello biologico nei saggi di ecotossicità

I copepodi sono piccoli crostacei ampiamente diffusi in quasi tutti gli ambienti acquatici, sia marini sia d'acqua dolce e, in termini di individui, costituiscono il *taxon* di metazoi più abbondante sulla Terra (Mauchline, 1998). Ad oggi sono state descritte più di 14000 specie, altamente diversificate nella biologia e nell'ecologia, caratterizzate da una notevole varietà di morfologie, strategie di vita e preferenze di habitat (Bernot et al., 2021). Costituiscono la classe *Copepoda*, del subphylum *Crustacea*, e sono suddivisi in dieci ordini, di cui i principali sono *Calanoida*, che include specie prevalentemente marine e pelagiche, *Cyclopoida*, con specie sia d'acqua dolce sia marine, pelagiche o forme parassitarie, e *Harpacticoida*, le cui specie sono prevalentemente marine e bentoniche (Wootton & Castellani, 2017).

I copepodi pelagici rappresentano la principale componente del mesozooplancton marino, di cui possono costituire tra il 55 e il 95% della biomassa e, in quanto consumatori primari, svolgono un ruolo fondamentale nella catena trofica, fungendo da anello di congiunzione tra i produttori primari e i livelli trofici superiori: essi infatti si cibano di fitoplancton e di protozoi, sono consumatori di detrito e vengono predati da un'ampia varietà di organismi planctivori, come altri invertebrati, pesci, balene e anche uccelli marini (Wootton & Castellani, 2017; Turner, 2004). Sono componenti particolarmente importanti nella dieta delle larve di molte specie di pesci, tanto che eventuali fluttuazioni nelle abbondanze dei copepodi delle comunità zooplanctoniche possono avere ricadute negative sulla sopravvivenza di popolazioni naturali di diverse specie ittiche (Beaugrand et al., 2003). Inoltre, attraverso la caduta delle *exuviae* e delle palline di feci (*faecal pellets*) verso il fondale, i copepodi contribuiscono al trasferimento di materia organica ed energia dagli strati superiori a quelli inferiori della colonna d'acqua, alimentando così un importante flusso di carbonio e nutrienti per il sostentamento delle comunità bentoniche (Frangoulis et al., 2011).

Infine, i copepodi planctonici hanno suscitato un grande interesse per il loro utilizzo nell'acquacoltura, dove sia gli stadi larvali sia gli adulti costituiscono una fonte di cibo molto più ricca in acidi grassi e proteine rispetto ad altri invertebrati più comunemente utilizzati nei mangimi, come *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) e i rotiferi (*Brachionus* spp.) (Drillet et al., 2008; Støttrup, 2000).

I copepodi sono stati utilizzati come modello biologico in ecotossicologia fin dagli anni ’70 del secolo scorso e da allora sono stati sviluppati diversi protocolli e linee guida, standardizzati a livello internazionale, con le metodologie da seguire nei saggi di tossicità (ISO 14669:1999, 16778:2015; ASTM, 2004; OECD, 2007). Alcune delle specie più comunemente impiegate sono il copepode calanoide *Acartia tonsa* (Dana, 1849) e gli arpacticoidi *Nitocra spinipes* (Boeck, 1865), *Tisbe battagliai* (Volkmann-Rocco, 1972), *Amphiascus tenuiremis* (Brady and Robertson, 1880) e alcune specie del genere *Tigriopus* (Kwok et al., 2015).

Vi sono numerosi aspetti che hanno contribuito ad identificare i copepodi come ottimi organismi bioindicatori da utilizzare nei test ecotossicologici: sono ampiamente diffusi a livello globale, rivestono un ruolo chiave negli ecosistemi marino-costieri e risultano sensibili ad un ampio spettro di contaminanti. Inoltre, biologia ed ecologia dei copepodi sono ampiamente conosciute e supportate da una numerosa produzione scientifica. Presentano un ciclo vitale relativamente breve, il che permette di strutturare diverse tipologie di test, con esposizione sia acuta sia cronica, indagando eventualmente anche effetti transgenerazionali, e offrono la possibilità di utilizzare diverse fasi del loro ciclo vitale, dagli stadi larvali (*Early Life Stages*, ELS) fino agli adulti, consentendo così lo studio di diversi endpoint per una valutazione più ampia sugli effetti tossici del contaminante. Infine, sono facilmente mantenuti in laboratorio attraverso l’allestimento di colture che rendono disponibile la specie durante tutto l’anno (Picone et al., 2018, 2022a).

Inoltre, negli ultimi anni i copepodi sono stati proposti come organismi indicatori per lo studio degli effetti di contaminanti emergenti, quali i pesticidi neonicotinoidi e altri composti chimici che possono agire come *endocrine disruptors* (Andersen et al., 2001; Picone et al., 2021, 2022a; Kusk et al., 2011; Wollenberger et al., 2003). Infatti, i copepodi presentano alcuni processi biologici, come la crescita tramite mute e metamorfosi e la riproduzione, che sono regolati da una complessa attività ormonale ed eventuali anomalie in questi processi possono evidenziare la presenza di un effetto negativo in risposta all’azione degli interferenti endocrini (Picone et al., 2018).

Per l’esecuzione dei test di tossicità descritti nel presente elaborato è stata utilizzata la specie *Acartia tonsa* (Dana, 1849) (Fig.2), un copepode calanoide molto diffuso nelle acque costiere dove rappresenta una componente importante dello zooplancton, e che, presentando tutte le caratteristiche sopra descritte di un buon organismo indicatore, viene comunemente utilizzato nei saggi di ecotossicità, anche in protocolli standard internazionali.

Fig.2 – Femmina di Acartia tonsa *(Dana, 1849)*
(Fonte: recifathome.com)

1.3.1 La specie indicatrice: *Acartia tonsa* (Dana, 1849)

Acartia tonsa (Dana, 1849) è un piccolo crostaceo planctonico, di dimensioni comprese tra 0,5 e 1,5 mm, ampiamente diffuso negli ambienti marino-costieri, soprattutto estuarini e salmastri.

Come altri copepodi calanoidi, *A.tonsa* presenta un corpo cilindrico e allungato, composto da undici segmenti, suddiviso in tre sezioni principali: la testa (o cefalosoma), torace (o metasoma) e addome (o urosoma) (Fig.3). Il cefalosoma e il metasoma formano una porzione compatta del corpo, detta prosoma, che si distingue nettamente dall'urosoma, più corto e sottile.

La parte anteriore del cefalosoma risulta essere generalmente arrotondato e presenta due paia di antenne, un singolo occhio naupliare in posizione mediana, un rostro disposto ventralmente, le appendici masticatorie e un paio di massillipedi. Il primo paio di antenne è molto lungo (può uguagliare la lunghezza dell'intero corpo) ed è solitamente ricoperto da sete e da strutture chemosensoriali.

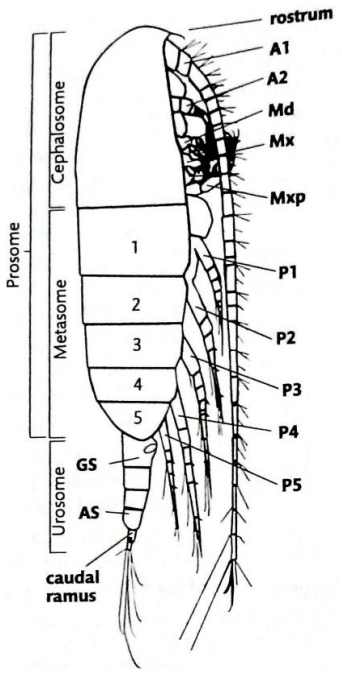


Fig.3 – Visione laterale di un copepode calanoide (Wootton & Castellani, 2017)
Legenda: A1-A2: antenne; Md, Mx: appendici masticatorie; Mxp: massillipedi; P1-P5: appendici natatorie; GS: segmento genitale; AS: segmento anale

Il metasoma è composto da cinque somiti, ciascuno con un paio di appendici natatorie. L'urosoma, invece, si compone di un numero variabile di segmenti, cinque nei maschi e quattro nelle femmine, generalmente privi di appendici: il primo somite è costituito dal segmento genitale, dove si situano gli orifizi genitali, mentre l'ultimo forma il segmento anale e presenta dei rami furcali provvisti di sete (Wootton & Castellani, 2017; Westheide & Rieger, 2011).

Gli individui adulti di *A. tonsa* presentano un leggero dimorfismo sessuale, avendo alcuni caratteri sessuali secondari utili all'identificazione dei maschi e delle femmine (Fig.4). Infatti, la femmina si può distinguere per essere leggermente più grande del maschio (rispettivamente 1,0-1,2 mm e 0,8-0,9 mm) e dalla forma arrotondata del cefalosoma rispetto alla forma più squadrata del maschio. Un altro carattere distintivo è la forma del primo paio di antenne: nelle femmine le antenne sono dritte, mentre nei maschi sono leggermente arcuate in prossimità del corpo e all'estremità

Fig. 4 – Maschio (a sx) e femmina (a dx) di Acartia tonsa *(Fonte: diark.org)*

presentano dei segmenti prensili utili per aggrapparsi alla femmina durante l'accoppiamento. Infine, nei maschi l'ultimo paio di appendici natatorie è più piccolo e asimmetrico, modificato per l'accoppiamento, mentre nelle femmine, il segmento genitale è fuso con il primo segmento addominale, formando così un duplice segmento genitale, più grande e prolungato (Wootton & Castellani, 2017; Wollenberger, 2005).

Per quanto riguarda l'anatomia interna, il sistema digerente è formato dall'apparato boccale, delimitato da un *labrum* superiore e un *labium* inferiore con mandibole e mascelle, e da un canale alimentare che comprende l'esofago, lo stomaco, l'intestino e l'ano, posto in corrispondenza del segmento anale dell'urosoma. L'apparato circolatorio non è molto sviluppato, costituito da un piccolo cuore, situato sopra i visceri, da cui si diparte un'aorta che raggiunge il capo. Poiché non sono presenti branchie, la respirazione si attua tramite un sistema di seni e cavità sotto il tegumento che consente gli scambi gassosi. Il sistema nervoso si compone di un ganglio soprafaringeo trilobato, da cui si estende una corda neurale fino alla parte posteriore del metasoma.

L'apparato riproduttore femminile consiste in un grande ovaio, situato dorsalmente tra la testa e il torace, da cui si dipartono due ovidotti che terminano nei ricettacoli seminali, o spermateche, posti in corrispondenza del segmento genitale. Nei maschi, invece, è presente un testicolo nella zona medio-dorsale collegato tramite il vaso deferente alla vescicola seminale, dove gli spermatozoi vengono raccolti nella spermatofora, un sacco cuticolare rilasciato durante l'accoppiamento. La fecondazione infatti è indiretta e avviene a seguito del passaggio della spermatofora dal maschio ai pori genitali femminili: qui gli spermatozoi fecondano le uova poco prima del loro rilascio in acqua (Mauchline, 1998; Westheide & Rieger, 2011).

Il ciclo vitale di *A. tonsa* si compone di tredici differenti stadi di sviluppo (Fig.5): lo stadio di uovo, sei stadi naupliari (NI-NVI), cinque stadi di copepodite (CI-CV) e lo stadio di adulto (CVI) (Kwok et al., 2015).

Le uova sono sferiche, di color azzurro tenue e hanno un diametro di 70-80 µm. La schiusa avviene generalmente entro 48h dopo il rilascio in acqua, ma possono essere prodotte anche uova quiescenti che ritardano la schiusa in funzione delle condizioni ambientali: queste ultime sono caratteristiche delle popolazioni presenti nel Nord Atlantico e nel Mar

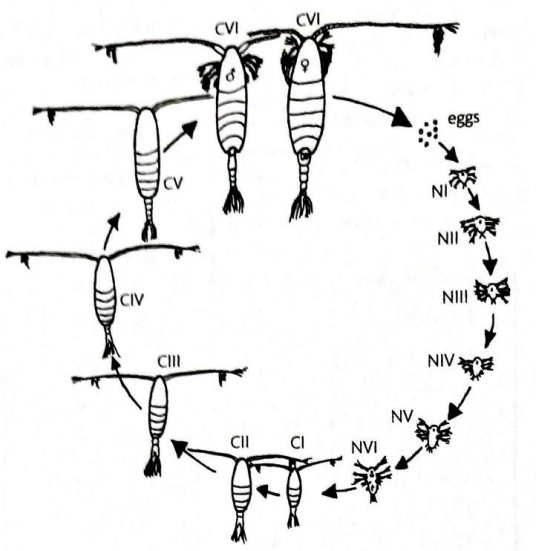


Fig. 5 – Ciclo vitale di un copepode calanoide come A.tonsa *(Wootton & Castellani, 2017)*

Baltico per far fronte alle rigide temperature invernali (Zhang et al., 2015; Hansen et al., 2010).
I naupli si presentano con una morfologia totalmente diversa dall'individuo adulto, avendo una forma triangolare, priva di segmentazione, e possiedono solo tre paia di appendici (due paia di antenne ancora poco sviluppate e le mandibole) funzionali al nuoto e successivamente all'alimentazione. Ciascun stadio naupliare è segnato da un processo di muta che consente l'accrescimento e lo sviluppo delle altre appendici del cefalosoma. Una volta allo stadio NVI, il nauplio affronta una metamorfosi che lo porta al primo stadio di copepodite (CI). Tale metamorfosi segna un netto cambiamento nella morfologia dell'organismo che ormai, come copepodite, risulta molto simile all'adulto, con il corpo già organizzato in tagmi. Con i successivi cinque processi di muta (CI-CV), il copepodite sviluppa progressivamente i somiti del metasoma e dell'urosoma, fino a completare lo sviluppo con un'ulteriore muta, raggiungendo lo stadio di copepode adulto (CVI) (Wootton & Castellani, 2017; Mauchline, 1998).
La durata dello sviluppo dipende prevalentemente dalla temperatura e dalla disponibilità del cibo: a temperature tra 15 e 20°C, la metamorfosi da nauplio a copepodite avviene dopo cinque o sei giorni dalla schiusa, mentre lo stadio di adulto maturo viene raggiunto dopo 9-20 giorni (Wollenberger, 2005).

1.3.2 Distribuzione geografica e principali tratti ecologici

A. tonsa è una specie originaria della regione indo-pacifica, tuttavia attualmente è abbondantemente diffusa anche nell'Oceano Atlantico e nei mari europei, dove vi è giunta trasportata probabilmente dalle acque di zavorra delle navi (Mauchline, 1998). La sua presenza nel Mar Mediterraneo risale agli anni '80 del secolo scorso, quando è stata osservata nelle acque adiacenti alla costa francese. Successivamente è stata riscontrata anche in Italia, nella Laguna di Lesina e lungo le coste dell'Alto Adriatico, in particolare nella Laguna di Venezia e nelle lagune del Delta del Po (Camatti et al., 2019). In quanto specie alloctona, la sua introduzione ha portato progressivamente ad un cambiamento nella struttura delle comunità zooplanctoniche, determinando una diversa distribuzione spaziale delle specie e causando la scomparsa di specie cogeneriche autoctone (Camatti et al., 2019).
A. tonsa mostra una netta preferenza per le acque costiere, dove risulta essere maggiormente abbondante soprattutto durante il periodo estivo, mentre in mare aperto viene progressivamente sostituita dalla specie autoctona *Acartia clausi* (Camatti et al., 2019; Sei et al., 2006). Tale preferenza è determinata dalle specifiche condizioni ambientali che, in termini di intervalli di temperatura, salinità e disponibilità di cibo, negli ambienti estuarini e salmastri risultano maggiormente ottimali per la sopravvivenza e lo sviluppo della specie. *A. tonsa*, infatti, viene generalmente considerata una specie eurialina ed euriterma, essendo in grado di acclimatarsi ad un ampio range di salinità, da 5 a

30‰ (Cervetto et al., 1999), e temperatura, tra -1 e 32°C (Gonzalez, 1974). Tuttavia, è stato osservato che vi sono degli intervalli di optimum per tali parametri che favoriscono lo sviluppo degli individui. Ad esempio, le uova riescono a schiudersi a temperature comprese tra i 5 e i 25° C (Uye & Fleminger, 1976), ma solo a temperature superiori a 15°C i naupli possono svilupparsi correttamente. Inoltre, i naupli necessitano solitamente di una salinità inferiore al 25‰ per poter sopravvivere (Tester & Turner, 1991), mostrando una finestra di adattamento ottimale tra 15 e 22‰ (Cervetto et al., 1999).
Anche la disponibilità di cibo è un fattore importante che può influenzare la sua distribuzione: *A.tonsa* è una specie onnivora, si nutre prevalentemente di fitoplancton ma può assumere una dieta più variegata, cibandosi anche di protozoi e di detrito. Negli ambienti costieri, dove si rinvengono maggiori concentrazioni di nutrienti e fitoplancton, la specie riesce ad ottimizzare l'assunzione di cibo per sostenere lo sviluppo e la riproduzione (Paffenhöfer & Stearns, 1988; Camatti et al., 2019). Infatti, la sua capacità di produrre uova è strettamente collegata alla disponibilità e alla qualità del cibo: non accumulando riserve energetiche, quanto assunto attraverso la dieta viene direttamente investito nella riproduzione ed un eventuale peggioramento delle condizioni alimentari può portare ad una netta diminuzione della quantità e qualità delle uova prodotte, influenzando così il suo successo riproduttivo (Kiørboe et al., 1985; Jónasdóttir, 1994).
A. tonsa è comunque una specie caratterizzata da una notevole capacità di adattamento a repentini cambiamenti ambientali e questo ha favorito il successo della sua diffusione a livello globale, riuscendo a trarre i vantaggi maggiori dagli ecosistemi eutrofici (Camatti et al., 2019).

1.3.3 L'impiego di *Acartia tonsa* in ecotossicologia

Come già precedentemente accennato, *A. tonsa* è una delle principali specie di copepodi utilizzate nei test di tossicità, grazie alla vasta diffusione globale e alla sua rilevanza ecologica come importante componente dello zooplancton marino. Inoltre, le caratteristiche del suo ciclo vitale, breve e chiaramente suddiviso in diversi stadi, permettono di effettuare test con le tre tipologie di esposizione (acuta, sub-cronica e cronica) e di analizzare diversi "parametri-risposta", o endpoint, che evidenziano un eventuale effetto negativo del contaminante sull'organismo. Tali parametri riguardano vari processi biologici che possono essere colpiti dall'azione del composto tossico, come la crescita e la riproduzione. Alcuni degli endpoint maggiormente utilizzati per *A. tonsa* sono la mortalità degli individui adulti, la produzione di uova, il successo di schiusa, la mortalità delle fasi larvali e la capacità di effettuare la metamorfosi tra nauplio e copepodite (Picone et al., 2018, 2022a).
La scelta degli endpoint è direttamente condizionata dalla modalità di esposizione del test, in quanto i test acuti e cronici mirano a studiare effetti diversi e si concentrano solitamente su diverse fasi del ciclo vitale. L'endpoint più comunemente utilizzato è la mortalità, caratteristico soprattutto dei test

acuti, mentre gli altri che riguardano sviluppo e riproduzione sono oggetto dei test sub-cronici e cronici. Questi ultimi, dunque, analizzano endpoint che non riguardano solo la sopravvivenza dell'individuo ma anche le conseguenze sulla sopravvivenza della popolazione nel lungo periodo.

A. tonsa è stata ampiamente utilizzata negli studi ecotossicologici sin dalla fine degli anni '70. Nel 1978 la *US Environmental Protection Agency* (US EPA) ha inserito *A. tonsa* come organismo indicatore nelle linee guida per i test di tossicità acuta, redigendo il primo protocollo ufficiale che ha impiegato i copepodi marini come bioindicatori nei saggi tossicologici (Kwok et al., 2015).
Successivamente anche la *International Organization for Standardization* (ISO) ha incluso *A. tonsa* tra le specie di copepodi consigliate per l'esecuzione dei test di tossicità. In particolare, nel 1999 è stata pubblicata la procedura ISO 14669 che propone una metodologia per un test di tossicità acuta su individui adulti di tre specie di copepodi (*A. tonsa*, *N. spinipes* e *T. battagliai*) volta a valutare gli effetti di composti chimici e la tossicità di effluenti industriali e di campioni di acque marine e salmastre (ISO, 1999). Nel 2015, è stato pubblicato il metodo standard ISO 16778 che prevede l'impiego delle fasi larvali di *A. tonsa* a partire dallo stadio di uovo fino alla metamorfosi da nauplio a copepodite. È un test di tossicità sub-cronico che dura cinque o sei giorni e che analizza il tasso di sviluppo larvale (*Larval Develpment Ratio* o LDR) e il tasso di mortalità delle *early life stages* (ELS), sfruttando la maggiore sensibilità di quest'ultime rispetto alla fase adulta per valutare gli eventuali effetti tossici di un contaminante o di un campione d'acqua marina o salmastra oggetto d'indagine (ISO, 2015). Questo test è stato modificato e applicato anche per testare la tossicità del sedimento (Picone et al., 2018). Altre procedure standardizzate che utilizzano gli stadi larvali sono state proposte da Gorbi et al. (2012), sia per test acuti (di 24-48h) sia subcronici (di 7 giorni).
Parallelamente alle metodologie ufficiali, *A. tonsa* viene impiegata nello sviluppo di test sperimentali che combinano l'utilizzo di diversi endpoint, come la produzione di uova, lo sviluppo larvale e la sopravvivenza della generazione figlia, per acquisire ulteriori informazioni sulle modalità di azione dei contaminanti (Picone et al., 2022a, 2023). Questo consente di individuare eventuali effetti a livello riproduttivo e di approfondire l'indagine sui nuovi contaminanti emergenti che possono agire come interferenti endocrini.

La scelta dell'organismo indicatore risulta fondamentale affinché il saggio di tossicità possa dare una risposta valida sui potenziali effetti negativi della presenza di un contaminante in ambiente. Infatti, oltre ad evidenziare un eventuale effetto tossico per la specie in sé, permette di inquadrare tale effetto in una più ampia valutazione ambientale, aggiungendo un significato ecologico alle informazioni riguardanti la tossicità del composto.

L'utilizzo di *A. tonsa* come organismo test per lo studio degli effetti dei filtri UV risulta essere particolarmente appropriato in quanto è una specie che, in condizioni naturali, si trova ad essere potenzialmente esposta a tali nuovi contaminanti emergenti. *A. tonsa*, infatti, si distribuisce lungo le zone costiere, maggiormente interessate al rilascio dei filtri UV, e si colloca negli strati superiori della colonna d'acqua, dove i filtri UV tendono a concentrarsi. Di conseguenza, eventuali effetti negativi su *A. tonsa* possono portare alla comparsa di effetti deleteri a livello di comunità o ecosistema, data la cruciale importanza di tale specie nella rete trofica, ed evidenziare così la presenza di un problema ambientale. Indubbiamente, tale eventualità deve essere ponderata anche in base alle concentrazioni di contaminante rilevate in ambiente, ben sapendo che queste possono variare notevolmente.

Dunque, considerando le già numerose indagini effettuate con esposizione acuta e una netta prevalenza in ambiente di concentrazioni dei filtri UV inferiori al mg L^{-1}, per i test di tossicità descritti nel presente lavoro è stato scelto di concentrare lo studio su test cronici e sub-cronici che possono simulare maggiormente le condizioni naturali e rendere dei risultati che si offrono ad una più ampia un'interpretazione ecologica.

2. Materiali e metodi

2.1 Mantenimento colture di *A. tonsa*

Per l'allestimento e il mantenimento delle colture di *A. tonsa* in laboratorio, è stata seguita la metodologia presentata in Picone et al., (2021, 2022b).

Il ceppo originale di *A. tonsa* è stato acquistato presso la Guernsey Sea Farms Ltd (Port Vale, Guernsey, UK), che ha fornito il set di individui adulti con cui è stata allestita la prima coltura madre. L'acqua di coltura è costituita da un medium con salinità al 20‰ (medium ISO), preparato secondo le indicazioni del metodo standard ISO 16778, che prevede la diluizione di una soluzione ipersalina al 10% con il medium M7 di Elendt in rapporto 1:4 (ISO, 2015). Queste due soluzioni si ottengono sciogliendo quantità note di sali in acqua ultrapura Milli-Q® e, variando il rapporto di diluizione, si può modificare la salinità del medium finale. Per le colture di *A. tonsa* è stata selezionata la salinità al 20‰, in quanto ottimale per il mantenimento e lo sviluppo degli organismi. Una volta effettuata la diluizione, il medium ISO viene filtrato con filtro a porosità 0,22 µm per trattenere eventuali impurità dei sali e/o componenti batteriche e successivamente viene conservato in cella frigorifera a 8-10°C.

Le colture di *A. tonsa* si compongono di circa 600/800 copepodi adulti posti in bottiglie di vetro di 2L riempite con medium ISO: vengono mantenute in una cella climatica ad una temperatura di 20±1°C, esposte ad un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio e collegate ad aeratori che consentono l'ossigenazione costante e favoriscono il contatto tra i copepodi e il cibo. La fonte di alimentazione consiste in un mix di tre microalghe, la clorofita *Tetraselmis suecica* ((Kylin) Butcher, 1959) e le aptofite *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) e *Tisochrysis lutea* (El M.Bendif & I. Probert, 2013), somministrato quattro volte al giorno tramite una pompa peristaltica temporizzata che mantiene una densità algale minima nelle colture di circa 10^3 cellule mL^{-1}. Il mix algale o *food mix* viene preparato ogni settimana in occasione del rinnovo delle singole colture algali.

Le colture algali, infatti, vengono allestite separatamente e mantenute in beute da 500 mL con il medium F/2 di Guillard (Guillard & Ryhter, 1962; Guillard, 1975) e rinnovate ogni 7 o 14 giorni. Il rinnovo viene effettuato sotto cappa a flusso laminare per evitare contaminazioni esterne e, prima di procedere, le beute con le colture algali, le beute per le nuove colture, il contenitore del medium F/2 e il contenitore per il mix algale vengono esposti per 3-5 min a radiazione UV per la sterilizzazione. Per il rinnovo di *I. galbana* e *T. lutea*, vengono versati circa 50 mL della coltura algale in una nuova beuta con 400 mL di medium F/2, mentre i restanti 400 mL della coltura madre vengono versati nel contenitore del *food mix*. Invece, per la coltura di *T. suecica* che ha un volume di circa 230 mL, vengono versati circa 25-30 mL nella nuova coltura e 200 mL nel mix algale. In questo modo, si ottiene settimanalmente un *food mix* di circa 1L, con un rapporto 2:2:1 tra le aptofite e la clorofita.

Le colture algali vengono poste nella stessa camera climatica delle colture di *A. tonsa*, dunque ad uguali condizioni di fotoperiodo e temperatura. Inoltre, per limitare la decantazione delle alghe sul fondo della beuta, le colture di *T. suecica* e *T. lutea* vengono poste in agitazione su un agitatore orbitale, mentre la coltura di *I. galbana* rimane in condizioni statiche. I dettagli riguardanti le composizioni del medium ISO e del medium F/2 sono riportati nelle tabelle presenti nell'Allegato B.

Periodicamente, ogni quattro o cinque settimane, viene avviata una nuova coltura di *A. tonsa* tramite l'aggiunta di 800-900 uova, precedentemente raccolte dalla coltura madre, in altre bottiglie da 2L riempite con medium ISO: in questo modo si garantisce una continua disponibilità di nuovi organismi test, per far fronte al naturale invecchiamento delle colture precedenti. Mantenuti alle condizioni sopra descritte, i copepodi raggiungono lo stadio adulto in circa 10-11 giorni e da allora iniziano a produrre uova che verranno raccolte e stoccate in frigorifero a circa 2-4°C, per il loro successivo utilizzo nei saggi di tossicità o per avviare nuove colture.
La raccolta delle uova avviene a seguito della pulizia delle colture, un'operazione che viene effettuata generalmente tre volte a settimana per rimuovere i pellet fecali, le alghe in eccesso e per prelevare le uova deposte e decantate sul fondo della bottiglia. La procedura di pulizia consiste nella sifonatura dell'acqua dal fondo della coltura tramite una pipetta in vetro di 10 mL che, collegata ad un tubo di gomma a cui si applica un'aspirazione con una siringa, consente all'acqua di fluire dalla coltura in una beuta di raccolta, fino ad un volume di circa 300 mL. Durante tale procedimento si raschia gentilmente il fondo della bottiglia con la pipetta per favorire la rimozione del detrito e delle uova. In seguito, quanto raccolto nella beuta viene filtrato attraverso due setacci in acciaio inox di maglia differente, rispettivamente 170 µm e 50 µm, per separare i copepodi adulti eventualmente aspirati, che vengono trattenuti dal setaccio a maglia più larga, dalle uova che, passando attraverso il primo setaccio, rimangono sul secondo a maglia più fine. Successivamente, i copepodi adulti recuperati vengono reimmessi nella coltura, mentre le uova vengono messe in piccole bottiglie in vetro da 30 o 50 mL, poi stoccate in frigorifero fino al loro utilizzo.
In seguito, viene controllata la quantità e la qualità delle uova raccolte per valutare il loro impiego nei test di tossicità. Viene prelevato un volume noto (0.5 o 1 mL) con una micropipetta e fatto filtrare, azionando una pompa da vuoto, su un filtro con griglia di diametro 47 mm e porosità 0.45 µm (filtro Whatman ME25), che viene poi osservato allo stereomicroscopio (Stemi SV6, Zeiss, Germany). Vengono così contate le uova e il loro numero viene rapportato al volume totale raccolto nella bottiglia per ottenere un'indicazione sulla quantità di uova presenti. Viene inoltre valutata la qualità delle uova osservandone il colore, che risulta essere di un azzurro intenso per le uova di maggiore qualità.

Lo stesso sistema di filtrazione con pompa da vuoto verrà utilizzato anche durante lo svolgimento dei test di tossicità.

2.2 I test di tossicità

Per lo studio degli effetti di BP-3 su *A.tonsa*, sono stati condotti tre test ecotossicologici, con esposizione sub-cronica e cronica: il test di sviluppo larvale o LDR, che comporta l'esposizione dell'organismo dallo stadio di uovo al primo stadio di copepodite (CI) (5/6 giorni), il test di produzione uova e pellet (*Egg and pellet production*), che prevede l'esposizione per 10 giorni dallo stadio di uovo al raggiungimento della maturità sessuale, a cui si somma un'ulteriore esposizione di 4 giorni in cui si misura la produzione di uova per valutare gli effetti sulla riproduzione e la produzione di pellet per valutare la capacità di alimentazione, e il test cronico (*long-term exposure test*), finalizzato a valutare in modo integrato gli effetti sulla riproduzione, ovvero verificare dopo un'esposizione di 21 giorni al contaminante se vi sono effetti sulla produzione di uova (effetto su generazione F_0) ed effetti sulla qualità delle uova prodotte e della prole (effetto su generazione F_1). Quest'ultima valutazione si ottiene con l'esecuzione di un test LDR effettuato con le uova prodotte dagli individui esposti nel test cronico.

2.2.1 Preparazione delle soluzioni di BP-3

Lo standard analitico di BP-3 è stato acquistato presso Sigma Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), da cui è stata preparata una soluzione stock, sciogliendo il composto in acetone (Sigma Aldrich, purezza > 99.5%), conservata successivamente a -20°C.

Le soluzioni test utilizzate nei saggi di tossicità vengono preparate attraverso diluizioni della soluzione stock di BP-3 nel medium di coltura ISO al 20‰, già arricchito con *food mix* per ottenere una concentrazione algale di circa $6x10^4$ cellule mL^{-1}. In questo modo si garantisce la stessa quantità di cibo per ciascun trattamento sperimentale e si evita la diluizione della concentrazione del tossico con l'aggiunta a posteriori della quantità di cibo necessaria alla sopravvivenza e allo sviluppo della specie test.

Inoltre, è stato verificato che la concentrazione del solvente nei vari trattamenti sperimentali non superasse le concentrazioni ritenute deleterie per la sopravvivenza di *A. tonsa*. Per il test di sviluppo larvale, la concentrazione di acetone (< 74 mg L^{-1}) è inferiore alla concentrazione rilevata da Andersen et al. (2001) in grado di interferire con lo sviluppo larvale della specie (157 mg L^{-1}), mentre per i due test cronici la concentrazione di acetone (< 7.3 mg L^{-1}) è inferiore alla concentrazione che

in altri test di tossicità non ha influenzato la capacità riproduttiva di *A. tonsa* (7.3 mg L^{-1}; Picone et al., dati non pubblicati).

2.2.2 Test di sviluppo larvale o LDR

Il test di sviluppo larvale fa riferimento al saggio di tossicità sulle *early life stages* di *A. tonsa* descritto nel metodo standard ISO 16778, eseguito nel presente lavoro secondo le modifiche riportate in Picone et al. (2021). Come già accennato, è un test di tipo sub-cronico che coinvolge i primi stadi larvali per valutare l'insorgere di effetti avversi sulla sopravvivenza e sullo sviluppo degli organismi. In particolare, si considera la capacità di effettuare la metamorfosi da nauplio a copepodite, un endpoint molto chiaro e facilmente individuabile, data la netta differenza morfologica tra le due fasi di sviluppo. Il test dura cinque o sei giorni, tempo necessario affinché, in condizioni controllate di laboratorio, circa il 40% degli organismi test raggiunga il primo stadio di copepodite (CI) (Picone et al., 2021). Il ritardo eventualmente rilevato nella metamorfosi risulta essere indicativo di un effetto tossico per gli stadi larvali della specie test.

Sono state scelte cinque concentrazioni nominali di esposizione (0.1 – 1 – 10 – 100 – 1000 µg L^{-1}), che comprendono un ampio range di concentrazioni di BP-3, incluse concentrazioni rinvenute in ambiente e concentrazioni di effetto nei confronti dei coralli, che sono state precedentemente selezionate sulla base di un test preliminare. A queste è stato affiancato un controllo negativo, costituito solo dal medium di coltura (medium ISO) arricchito con *food mix*. Per ciascuna concentrazione e per il controllo sono state disposte sei repliche.

Il test inizia (giorno 0) aggiungendo un noto numero di uova, compreso tra 25-45, in *vials* di vetro da 30 mL, contenenti 15 mL di soluzione test. Per conoscere l'esatto numero di uova immesso, si procede con la filtrazione su un filtro di cellulosa con griglia (diametro 47 mm, porosità 0.45 µm) di una piccola aliquota (200-300 µL) della sospensione di uova precedentemente raccolta. Tale aliquota, prelevata con una micropipetta, viene tarata in modo tale che possa contenere mediamente tra 30 e 50 uova. In seguito, il filtro viene osservato allo stereomicroscopio, vengono contate le uova con un contatore manuale e i naupli eventualmente presenti vengono eliminati per evitare che la loro presenza interferisca con i risultati finali del test. Le uova vengono immesse nelle *vials* risciacquando la superficie del filtro con la stessa soluzione test, utilizzando una siringa sterile. Il filtro viene poi ricontrollato allo stereomicroscopio per verificare che tutte le uova presenti siano state immesse. Sul quaderno di laboratorio vengono annotati il numero di uova immesso in ciascuna replica, a partire dal controllo fino alla concentrazione maggiore, e l'ora in cui si è svolta l'operazione, per avere un riscontro sul tempo trascorso dall'inizio del test. Successivamente, ciascuna *vial* viene sigillata con

Parafilm®, chiusa col proprio tappo e posta in camera climatica ad una temperatura di 20±1°C, con fotoperiodo di 16:8 luce:buio.

Come previsto dalla norma ISO 16778, dopo 48h dall'inizio del test (giorno 2) si procede con il rinnovo parziale delle soluzioni di ciascuna replica aggiungendo 15 mL di nuova soluzione test.

Il test finisce al giorno 5 quando circa il 40% degli organismi ha effettuato la metamorfosi tra nauplio e copepodite. Tuttavia, prima di procedere con la fissazione di tutte le repliche, bisogna verificare se tale condizione è stata o meno raggiunta. Dapprima si effettua un controllo visivo, osservando se nelle *vials* sono presenti copepoditi che, rispetto ai naupli che sono più piccoli e caratterizzati da un nuoto con movimenti circolari, sono riconoscibili dalla forma maggiormente allungata e dal nuoto rettilineo. In seguito, si prosegue con la fissazione di una replica del controllo con l'aggiunta di 0.5 mL di soluzione di Lugol, che fissa e colora gli organismi vivi presenti. La replica fissata viene filtrata su un filtro con griglia (analogo a quello utilizzato per la conta delle uova), che viene poi osservato allo stereomicroscopio e vi si contano i naupli, i copepoditi (Fig.6) e le uova non schiuse.

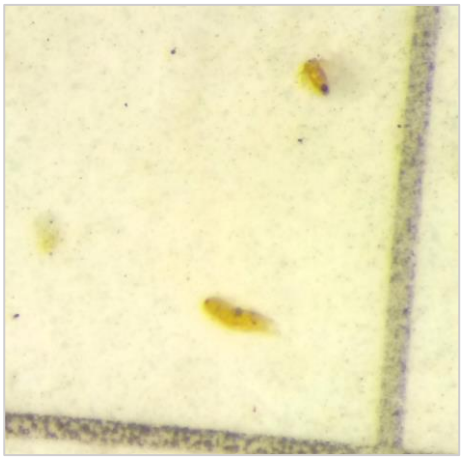


Fig.6 – Nauplio (in alto) e copepodite (in basso) dopo la fissazione con Lugol, osservati sul filtro allo stereomicroscopio (Foto: Maria Pirvu)

Se si riscontra la presenza di almeno 40% di copepoditi, si prosegue con la fissazione delle altre repliche per concludere il test. Altrimenti, si può decidere di aspettare altre 3-4 h prima di fissare un'altra replica del controllo e, nel caso tale condizione non venga nuovamente osservata, si rimanda la conclusione del test al giorno successivo (giorno 6), in quanto la finestra temporale di sviluppo può allungarsi per via di eventuali fluttuazioni nelle condizioni di esposizione in laboratorio.

Per ogni replica vengono annotati il numero di naupli, di copepoditi e delle uova non schiuse, che sono funzionali al calcolo dei parametri del test: il tasso di sviluppo larvale (*Larval Development Ratio*, LDR), la mortalità delle *early life stages* (ELS_m) e il tasso di schiusa (*Hatching rate*, H).

Il tasso di sviluppo larvale LDR è dato dal rapporto tra il numero di copepoditi e il numero totale di organismi in stadio larvale (naupli e copepoditi) rinvenuti e viene calcolato come in Eq. 1.

$$LDR = \frac{copepoditi}{naupli + copepoditi} \qquad \text{(Eq.1)}$$

Il parametro ELS_m rappresenta il tasso di mortalità delle larve entro il quinto giorno di esposizione e si calcola rispetto agli individui sopravvissuti (Eq. 2).

$$ELS_m = 1 - \frac{naupli + copepoditi}{uova_{t0} - uova_{t5}} \qquad \text{(Eq.2)}$$

dove le $uova_{t0}$ sono le uova immesse nelle *vials* all'inizio del test, mentre le $uova_{t5}$ sono le uova che non si sono schiuse e sono state rinvenute nella lettura finale del filtro al giorno 5.
Infine, si calcola il tasso di schiusa H facendo il rapporto tra le uova che si sono schiuse e le uova totali inizialmente immesse (Eq.3).

$$H = \frac{uova_{t0} - uova_{t5}}{uova_{t0}} \qquad \text{(Eq.3)}$$

2.2.3 Test di produzione uova e pellet

Il test di produzione uova e pellet (o *Egg and pellet production test*) è un test sperimentale che mira a valutare gli effetti sub-letali su riproduzione e alimentazione di *A. tonsa*. La metodologia è stata messa a punto dal gruppo di ricerca in ecotossicologia dell'Università Ca' Foscari e si articola principalmente in due fasi: nella prima, gli organismi vengono esposti al contaminante a partire dallo stadio di uovo fino al raggiungimento della maturità sessuale che, in condizioni controllate di laboratorio, avviene in 10-11 giorni. Successivamente, vengono isolate alcune femmine per ciascun trattamento sperimentale e, nei successivi quattro giorni, viene monitorata la produzione giornaliera di uova e di pellet, con lo scopo di verificare se l'esposizione al contaminante durante la fase di sviluppo comporta delle conseguenze a livello riproduttivo e/o alimentare, usando la produzione di uova come proxy dell'attività riproduttiva e la produzione di pellet come proxy dell'alimentazione.
In particolare, tale procedura viene adottata per valutare possibili effetti (inibitori o stimolatori) dei filtri UV sul raggiungimento della maturità sessuale dei copepodi e sui primi giorni di attività produttiva, ritenuti come il periodo più proficuo per la capacità riproduttiva degli organismi e per questo scelti per il monitoraggio della produzione di uova. Per questo test, è stata considerata la finestra temporale dei primi quattro giorni, durante i quali si osserva generalmente una progressiva crescita del numero di uova prodotte e vengono raggiunte le massime produzioni in termini di quantità e di qualità. Un effetto inibitorio si può tradurre in un inizio ritardato della produzione di uova o in una minore produzione di uova complessiva durante il periodo di osservazione considerato, mentre un effetto stimolatore si può manifestare con una maggiore produzione di uova, possibilmente associata a un anticipo nel raggiungimento della maturità sessuale. Invece, il conteggio dei pellet

viene effettuato per verificare se gli effetti sulla riproduzione sono legati a effetti sull'alimentazione, essendo questi due tratti generalmente collegati nei copepodi (Klok et al., 2012).

Sono stati allestiti cinque trattamenti sperimentali, di cui un controllo negativo (costituito dal medium ISO) e quattro concentrazioni nominali di esposizione (0.1 – 1 – 10 – 100 µg L^{-1}). Il range di concentrazioni è stato ristretto rispetto ai trattamenti del test LDR, in considerazione di un periodo di esposizione più lungo, della maggiore sensibilità degli endpoint considerati e della maggiore rilevanza ambientale, in quanto tale range viene più comunemente rinvenuto in ambiente.

Il test inizia con l'aggiunta di 200/300 uova in bottiglie di vetro da 500 mL, una per ciascun trattamento, riempite con la soluzione test. Le uova, precedentemente raccolte dalla coltura madre, vengono contate su un filtro allo stereomicroscopio e inserite nelle bottiglie in modo analogo alla procedura d'inizio del test LDR. Ciascuna bottiglia (o coltura test) viene chiusa col proprio tappo, sigillata con Parafilm® e posizionata su un *rotatory mixer* (mod. Rotex, VELP Scientifica, IT) (Fig. 7), impostato per effettuare un giro al minuto, per la durata di 10 giorni.

Fig. 7 – Rotatory mixer (VELP Scientifica) (Fonte: velp.com)

Il rinnovo delle soluzioni viene effettuato i giorni 2, 5 e 7 del test, rimuovendo metà della soluzione (250 mL) tramite sifonatura e aggiungendo lo stesso volume di nuova soluzione. In questo modo si tenta di mantenere la concentrazione di esposizione costante, ovviando alla possibile degradazione del contaminante che può avvenire nella bottiglia, e si fornisce il cibo alla coltura test, in quanto ogni nuova soluzione viene preparata con l'aggiunta del *food mix*. Per la sifonatura si procede analogamente alla pulizia delle colture: si inserisce nella bottiglia una pipetta di 10 mL collegata ad un tubo di gomma e, applicando un'aspirazione all'estremità del tubo, si favorisce la risalita dell'acqua che viene riversata in una beuta di raccolta. Il volume raccolto (250 mL) viene filtrato con un setaccio di maglia 60 µm per recuperare i copepodi eventualmente aspirati e viene prelevata un'aliquota di 50 mL in provette di polipropilene per la misurazione di pH e ossigeno disciolto. I rimanenti 200 mL vengono versati in bottiglie ambrate e destinati all'archivio per eventuali futuri approfondimenti di natura chimica e tossicologica. Dopo aver aggiunto il volume di nuova soluzione, i copepodi trattenuti dal setaccio vengono reimmessi nelle bottiglie.

Il giorno 10 termina il periodo di esposizione nelle colture test e tutto il contenuto viene filtrato attraverso un setaccio di maglia 150 µm. Vengono prelevate le due aliquote da 50 e 200 mL per la misurazione dei parametri (pH e ossigeno disciolto) e per l'archivio e i copepodi trattenuti sul setaccio vengono posti in cristallizzatori di vetro da 200 mL per analizzarne allo stereomicroscopio la motilità,

il sesso e lo stadio di sviluppo. In seguito, si procede con l'isolamento delle femmina: una prima analisi allo stereomicroscopio consente di selezionare dieci femmine che vengono poste ognuna in un pozzetto di una piastra sterile in polistirene da 24 pozzetti, per essere poi osservate al microscopio e confermare il sesso dell'individuo con un'osservazione più accurata.

Nel frattempo, per ciascun trattamento sperimentale vengono allestite dieci *vials* in vetro da 30 mL contenenti 25 mL di soluzione test con la stessa concentrazione utilizzata nelle colture test. Una volta effettuato il controllo al microscopio, si procede con l'inserimento con una pipetta di ciascuna femmina in una *vial* del corrispettivo trattamento sperimentale. Le *vials* vengono poi chiuse col proprio tappo e poste in laboratorio a temperatura 20 ± 2° C e fotoperiodo 16:8 luce:buio.

Dopo 24h (giorno 11), si procede col controllo della produzione di uova e di pellet, effettuato poi ogni giorno fino al giorno 14. Le femmine vengono prelevate con una pipetta, poste in altre *vials* con nuova soluzione test e il contenuto delle vecchie *vials* viene filtrato su un filtro con griglia (Ø 47mm, porosità 0.45 µm), che viene osservato allo stereomicroscopio, contando le uova e i pellet rinvenuti. I dati ottenuti vengono espressi come produzione di uova per femmina al giorno (uova femmina^{-1} g^{-1}) e produzione di pellet per femmina al giorno (pellet femmina^{-1} g^{-1}), considerando solo i dati relativi alle femmine che sono sopravvissute fino al giorno 14.

2.2.4 Test cronico

Il test cronico (o *long-term exposure test*) risulta essere simile al test di produzione uova e pellet sopra descritto, che viene leggermente modificato per studiare gli effetti di un'esposizione maggiormente prolungata (21 giorni) su capacità riproduttiva e alimentazione di *A. tonsa*. Tale esposizione prolungata consente alla specie test di compiere l'intero ciclo vitale in presenza del contaminante, oltrepassando lo stadio del raggiungimento della maturità: in questo modo si potranno valutare gli effetti sulla riproduzione legati alla qualità degli adulti, attraverso la produzione di uova, e alla qualità della prole, in termini di capacità di schiusa, di sopravvivenza e di sviluppo larvale.

Con questo test, in particolare, si intendono valutare anche i possibili effetti transgenerazionali. Infatti, le uova prodotte dagli individui esposti durante questo test vengono successivamente utilizzate per svolgere un test LDR per indagare se l'esposizione al contaminante della generazione parentale (F_0) interferisca sulla qualità delle uova prodotte, quindi sulla capacità di schiusa e di sviluppo della generazione F_1. Per il test LDR si è scelto di esporre le uova al solo medium ISO per rilevare gli effetti dovuti solamente all'esposizione parentale e non considerare ulteriori effetti dovuti anche all'esposizione della prole.

Per questo test cronico, sono stati allestiti quattro trattamenti sperimentali, un controllo negativo e tre concentrazioni nominali di esposizione: 0.1 – 1 – 10 µg L^{-1}, scelti in base ai risultati del test *Egg and pellet production* e disposti ciascuno in una bottiglia di vetro da 1 L. Le tre concentrazioni di esposizione sono state selezionate in modo da coprire il range di concentrazioni più tipicamente rilevato in ambiente.

Il test inizia aggiungendo circa 300/400 uova nelle colture test che, dopo essere state chiuse col tappo e sigillate con Parafilm®, sono state poste sul *rotatory mixer* impostato per effettuare un giro al minuto, per la durata di 21 giorni. Il rinnovo delle soluzioni è stato effettuato tre volte a settimana tramite sifonatura, travasando metà della soluzione (500 mL) in una beuta di raccolta e aggiungendo successivamente in bottiglia lo stesso volume di nuova soluzione. Il volume travasato è stato filtrato con un setaccio di maglia 60 µm per recuperare i naupli aspirati e, dal giorno 11, è stato utilizzato anche un setaccio di maglia 150 µm per poter dividere i copepodi adulti, poi reimmessi in bottiglia, dalle uova eventualmente prodotte. Inoltre, ad ogni rinnovo di soluzione è stata prelevata un'aliquota di 50 mL per la misurazione di pH e ossigeno disciolto, mentre l'aliquota (200 mL) destinata all'archivio è stata prelevata nei giorni 5, 9, 14, 19 e 21.

Il giorno 19 si procede con la selezione e l'isolamento delle femmine, effettuato con le stesse modalità del test *Egg and pellet production*: gli individui aspirati durante il rinnovo della soluzione vengono recuperati in cristallizzatori e osservati allo stereoscopio e al microscopio per l'accertamento del sesso. Le femmine vengono prelevate e poste singolarmente in *vials* di vetro da 30mL riempite con 25 mL di soluzione test analoga a quella del proprio trattamento sperimentale. Per i successivi tre giorni, si effettua il controllo della produzione di uova e pellet, prelevando e inserendo le femmine in *vials* con nuova soluzione test e filtrando il contenuto della *vial* precedente su un filtro con griglia, poi esaminato allo stereomicroscopio, contando uova e pellet. Questa attività viene effettuata per valutare la produttività degli adulti a seguito di un'esposizione prolungata con il contaminante e collegarla con gli esiti del test di sviluppo larvale sulla generazione F_1 successivamente svolto.

Inoltre, nei giorni 19, 20 e 21 le uova prodotte in ciascuna coltura test vengono prelevate tramite sifonatura e successiva filtrazione del volume raccolto su un setaccio di maglia 60 µm. Le uova recuperate vengono poi messe in bottiglie di vetro da 50 mL, una per ciascun trattamento, e stoccate in frigorifero a 4°C fino al loro utilizzo. Il giorno 21 viene allestito il test LDR sulla generazione F_1, utilizzando preferibilmente le uova raccolte il giorno stesso. La metodologia seguita è analoga a quella riportata per il test LDR nel Paragrafo 2.2.2. In questo caso, il medium di esposizione è costituito solo dal medium ISO per valutare se le uova prodotte da una generazione esposta al contaminante risentano, in termini di capacità di sopravvivenza e di sviluppo, dell'esposizione dei genitori. Tale valutazione viene effettuata in assenza di contaminante per evitare di sommare effetti

dovuti a una nuova esposizione agli effetti derivanti dall'esposizione parentale. Al termine del test vengono calcolati i parametri LDR, ELS_m e H.
I dati relativi ai parametri chimico-fisici misurati (pH e ossigeno disciolto) durante lo svolgimento dei test di tossicità sono riportati in dettaglio nelle tabelle dell'Allegato C.

2.3 Controllo di qualità e analisi statistica

Al fine di garantire l'affidabilità dei dati ottenuti dai saggi di tossicità effettuati, è stato verificato che i criteri di accettabilità per i parametri presi in considerazione nei tre diversi test (H, ELS_m, LDR per i test LDR e la produzione di uova per femmina al giorno (uova femmina^{-1} g^{-1}) per il test *Egg and pellet production* e il test cronico) venissero soddisfatti, secondo le indicazioni presentate in Picone et al. (2018, 2022a). Il set dei criteri di accettabilità e i corrispettivi valori ottenuti nei test effettuati su BP-3 sono riportati in dettaglio nella tabella presente nell'Allegato D.

Per l'analisi statistica, è stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA) a una via, effettuata dopo aver controllato le condizioni necessarie di omogeneità delle varianze, con il test di Levene, e di normalità dei residui, tramite il test di Shapiro-Wilk. Nel caso i risultati dell'ANOVA evidenzino almeno una differenza tra i gruppi confrontati, si è proceduto con il test di Tukey per individuare quale gruppo si differenzia rispetto agli altri. Qualora le condizioni di omogeneità delle varianze o di normalità dei residui non siano state soddisfatte, sono stati effettuati test alternativi, come il test di Kruskal-Wallis, quando i dati non sono distribuiti normalmente, e l'ANOVA di Welch quando le varianze dei dati, che pur presentano la condizione di normalità, non risultano omogenee. Le analisi statistiche sono state condotte con il programma Past, versione 4.7.0.0.
Infine, per valutare la dipendenza statistica tra la produzione di uova e la produzione di pellet è stata utilizzata la correlazione non parametrica di Spearman, effettuata con il software R.

3. Risultati

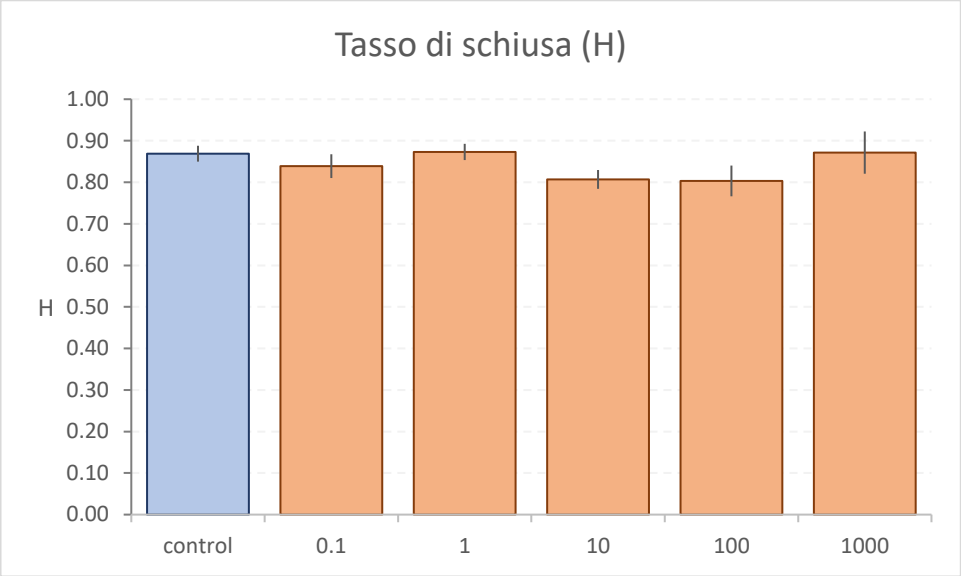
3.1 Test di sviluppo larvale

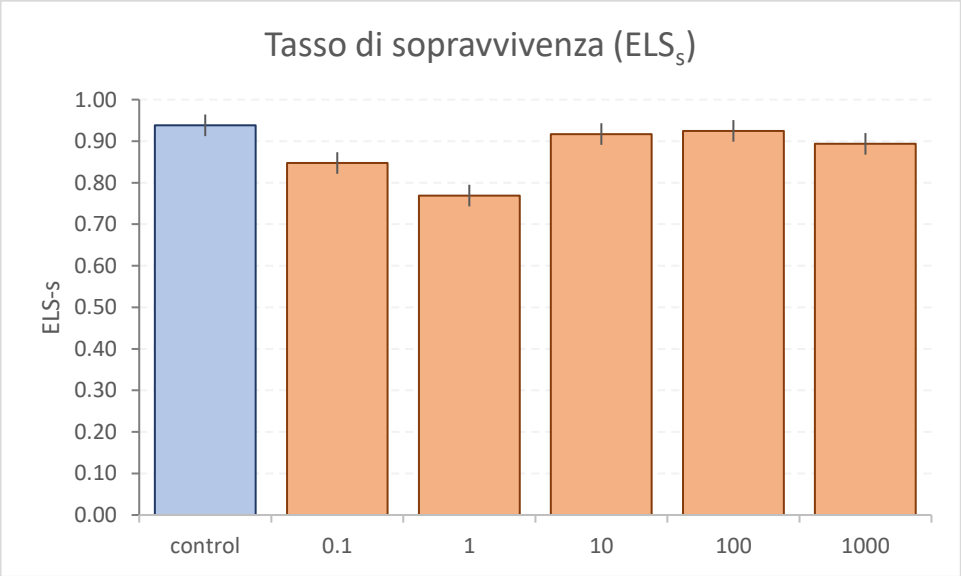
Nel test di sviluppo larvale, l'analisi statistica non ha riscontrato differenze significative tra i trattamenti per i tre endpoint presi in considerazione, dunque non sono stati rilevati effetti significativi di BP-3 né sul tasso di schiusa H (ANOVA a una via: $F = 1.21$, $p = 0.331$), né sul tasso di mortalità larvale ELS_m (ANOVA a una via: $F = 2.42$, $p = 0.060$), né sul tasso di sviluppo larvale LDR (ANOVA a una via: $F = 1.23$, $p = 0.320$).

Infatti, tutti i trattamenti hanno mostrato valori simili nel tasso di schiusa, con una media complessiva di 84% di uova schiuse. Per quanto riguarda ELS_m, il valore più elevato di mortalità larvale è stato osservato a 1 $\mu g\ L^{-1}$ con una percentuale del 23%, presentando un aumento del 19% rispetto al controllo. Infine, per il tasso LDR, la massima inibizione dello sviluppo larvale rispetto al controllo viene riscontrata a 100 e 1000 $\mu g\ L^{-1}$, con un valore approssimato di inibizione del 15%.

Di seguito (Fig.8) vengono riportati i grafici a barre relativi ai parametri H, ELS_s e LDR. È stato scelto di riportare il grafico del tasso di sopravvivenza larvale ELS_s, invece di ELS_m, per comodità nella visualizzazione.

Tutti i dati relativi al numero di uova, naupli e copepoditi rinvenuti durante il test sono riportati in dettaglio nell'Allegato E.





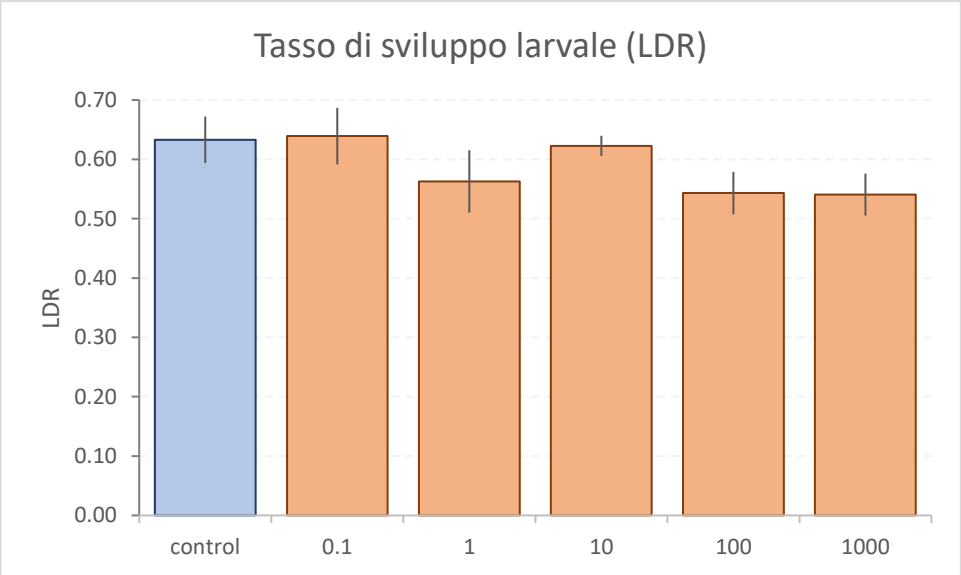


Fig.8 – Risultati del test LDR: tasso di schiusa H (in alto), tassi di sopravvivenza ELSs (in mezzo), tasso di sviluppo larvale LDR (in basso). Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

3.2 Test di produzione uova e pellet

Per il test di produzione uova e pellet, al termine del periodo di esposizione nelle colture test (giorno 10), tutti i copepodi rinvenuti nei vari trattamenti hanno raggiunto lo stadio di adulto e non hanno mostrato segni di narcotizzazione (i.e., incapacità di movimento o di reagire agli stimoli). Durante i quattro giorni di esposizione individuale in cui sono state contate le uova e i pellet, la mortalità delle femmine è stata inferiore al 16%, con una media di 3% tra i trattamenti.

In Fig. 9 viene riportata la produzione di uova per ciascun trattamento nei quattro giorni di osservazione. L'inizio di produzione di uova è stato osservato il giorno 11 in tutti i trattamenti, con una percentuale di femmine produttive tra 33-60%. Inoltre, nei tre giorni successivi, per tutti i trattamenti è stato rilevato un andamento crescente nella produzione di uova, con la percentuale di femmine produttive che aumenta tra 40-80% il giorno 12, tra 56-100% il giorno 13 e tra 80-100% il giorno 14. Conseguentemente, i valori minimi di produzione giornaliera di uova vengono riscontrati il giorno 11, mentre i valori massimi il giorno 14.

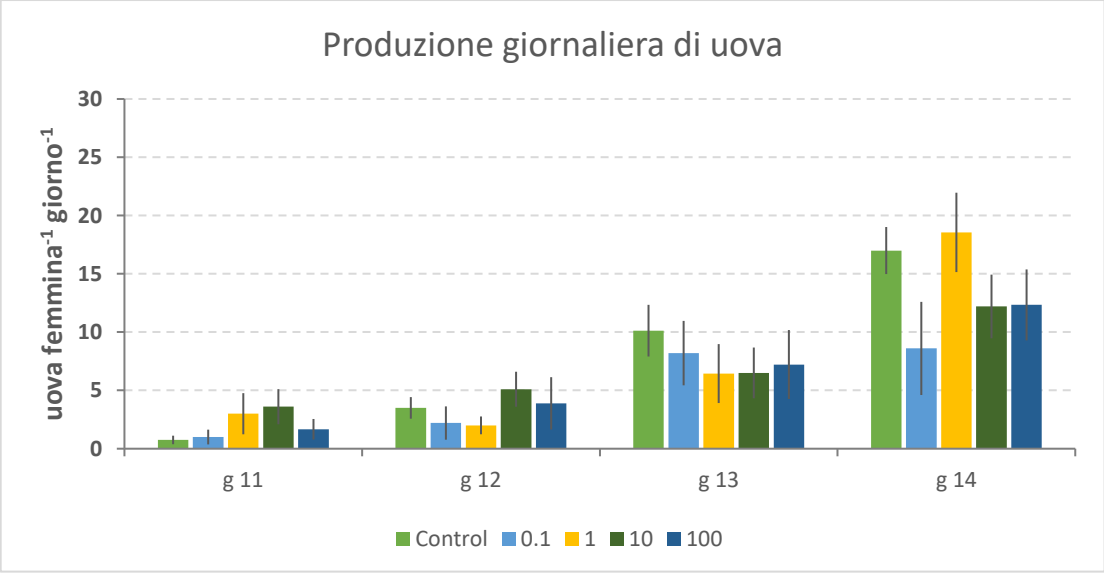


Fig. 9 – Produzione giornaliera di uova nei giorni 11, 12, 13 e 14 per i cinque trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

Nel controllo, la produzione giornaliera di uova varia tra 0.8 ± 0.4 uova per femmina al giorno (uova femmina^{-1} giorno^{-1}), misurate il giorno 11, e 17.0 ± 2.0 uova femmina^{-1} giorno^{-1} misurate il giorno 14. Invece, nei trattamenti di BP-3, la più bassa produzione di uova è stata rilevata il giorno 11 per il trattamento 0.1 µg L^{-1} con 1.0 ± 0.6 uova femmina^{-1} giorno^{-1}, mentre il massimo di produzione di uova è osservato il giorno 14 per il trattamento 1 µg L^{-1}, con 18.6 ± 3.4 uova femmina^{-1} giorno^{-1}.

In maniera analoga, la produzione giornaliera di pellet (Fig. 10) è aumentata durante i quattro giorni di esposizione individuale, con un valore medio tra i trattamenti di 48.5 ± 5.0 e 127.8 ± 8.2 pellet femmina^{-1} giorno^{-1} rinvenuti rispettivamente il giorno 11 e il giorno 14.

Nell'Allegato F vengono riportate le medie giornaliere della produzione di uova e pellet per ciascun trattamento.

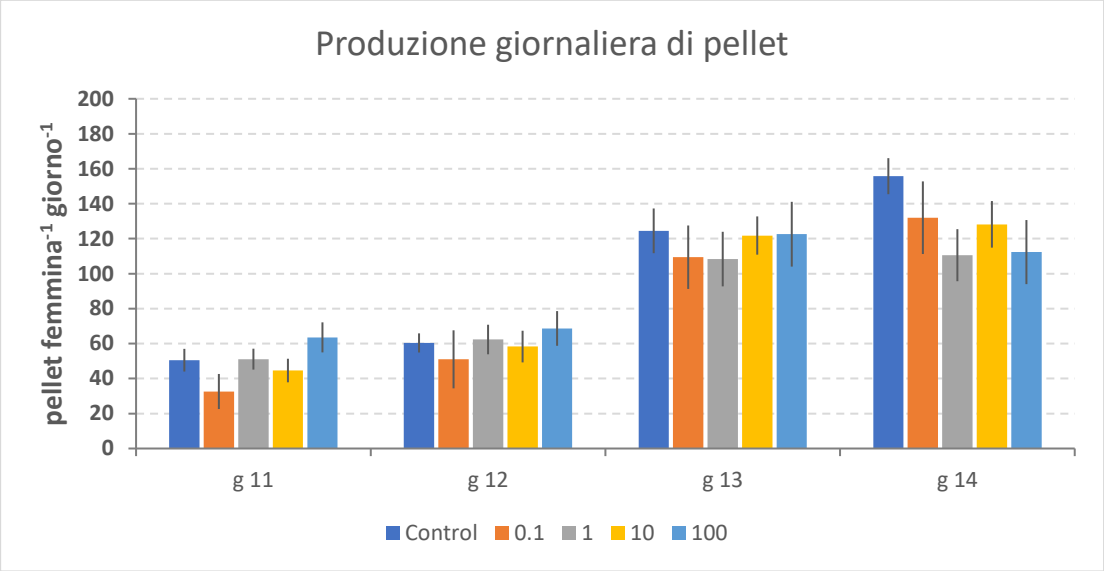


Fig. 10 – Produzione giornaliera di pellet nei giorni 11, 12, 13 e 14 per i cinque trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

In Tab.2 vengono riportati la media della produzione di uova e di pellet per femmina al giorno calcolata sui quattro giorni di osservazione.

Trattamenti	Produzione di uova (*uova femmina^{-1} giorno^{-1}*)	Produzione di pellet (*pellet femmina^{-1} giorno^{-1}*)
Controllo	7.8 ± 1.2	97.8 ± 6.3
0.1 µg L^{-1}	5.0 ± 1.7	81.3 ± 12.2
1 µg L^{-1}	7.5 ± 1.9	83.1 ± 10.3
10 µg L^{-1}	6.9 ± 1.5	88.2 ± 5.7
100 µg L^{-1}	6.2 ± 2.0	91.8 ± 11.9

Tab.2 – Valori di produzione di uova e pellet nei quattro giorni di osservazione, riportati come media ± errore standard.

Per quanto riguarda l'analisi statistica sulla produzione di uova, il test di Kruskal-Wallis, effettuato in quanto la condizione di normalità dei residui non è stata soddisfatta (Shapiro-Wilk: W=0.94, p = 0.036), non ha riscontrato differenze significative tra i trattamenti ($\chi^2 = 2.04$, p = 0.728). Come si può osservare anche dal grafico in Fig. 11, la produzione di uova nei trattamenti non si discosta in maniera significativa dalla produzione di uova misurata nel controllo.

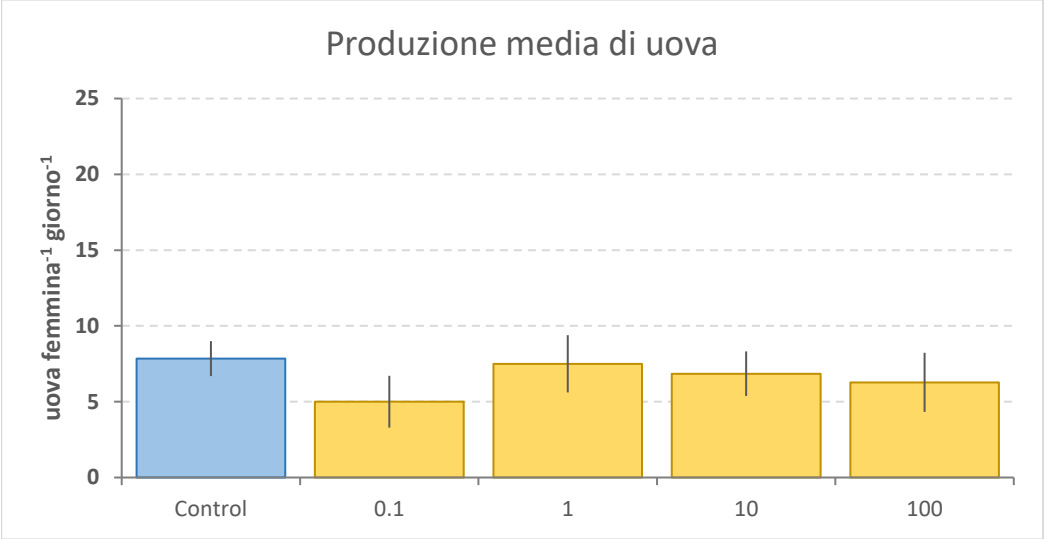


Fig. 11 – Produzione media di uova dal giorno 11 al giorno 14, per i cinque trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

Anche per la produzione di pellet, l'analisi statistica non ha rilevato differenze significative tra i trattamenti (ANOVA a una via: F = 0.45, p = 0.770), per quanto la produzione di pellet misurata nei trattamenti di BP-3 risulti mediamente inferiore alla produzione di pellet nel controllo (Fig. 12).
I grafici in Fig. 11 e in Fig. 12 fanno riferimento ai dati riportati in Tab.2.

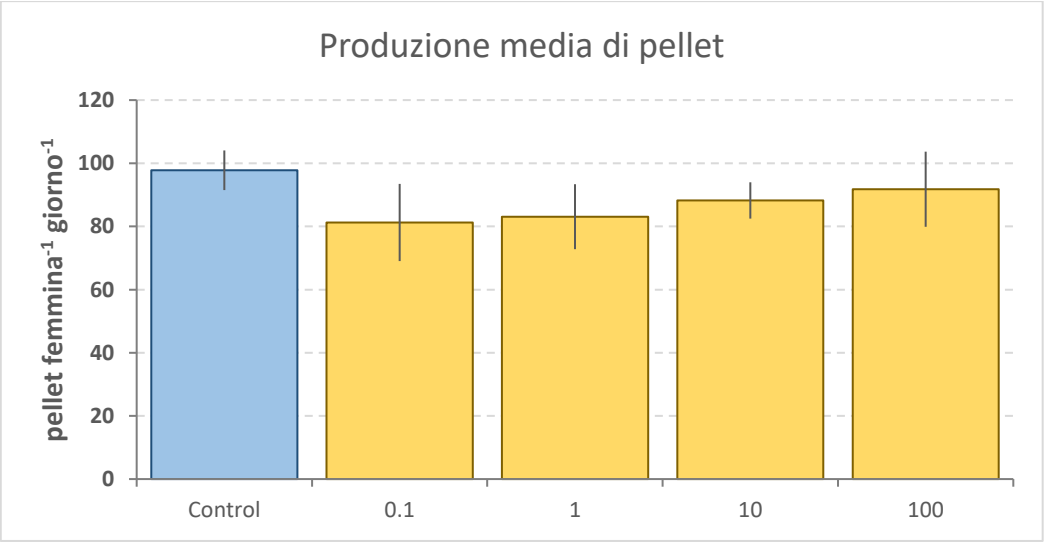


Fig. 12 – Produzione media di pellet dal giorno 11 al giorno 14, per i cinque trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

Infine, l'analisi della correlazione di Spearman ha riscontrato una correlazione positiva e significativa tra la produzione di uova e la produzione di pellet (Spearman's $\rho = 0.64$, $p < 0.001$). In Fig. 13 viene riportato il grafico della correlazione tra il numero di uova e il numero di pellet prodotti.

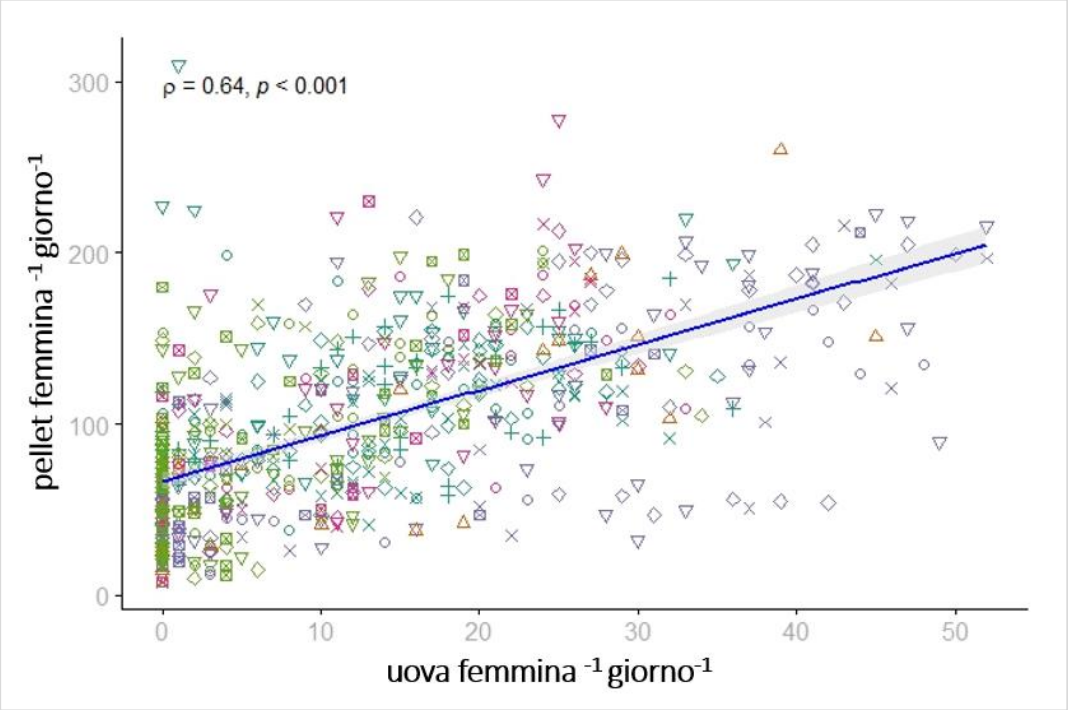


Fig. 13 – Correlazione tra il numero di uova e il numero di pellet prodotti durante i quattro giorni di osservazione.

3.3 Test cronico

Nel test cronico, dopo i 19 giorni di esposizione nelle colture test, i copepodi rinvenuti nei quattro trattamenti non hanno mostrato segni di narcotizzazione. Durante le 72h di esposizione individuale, sono stati riscontrati episodi di mortalità solo nei trattamenti 1 µg L^{-1} e 10 µg L^{-1}, rispettivamente con il 40% e il 10% di individui deceduti. Tuttavia, tale mortalità non è necessariamente dovuta all'azione del contaminante ma può considerarsi una mortalità naturale riconducibile al progressivo invecchiamento degli organismi esposti.

In Fig. 14 viene riportata la produzione giornaliera di uova nei tre giorni di osservazione. Il giorno 20, tutti i trattamenti hanno presentato un'elevata percentuale di femmine produttive, tra 80%, osservato nel trattamento 1 µg L^{-1}, e 100% negli altri trattamenti.

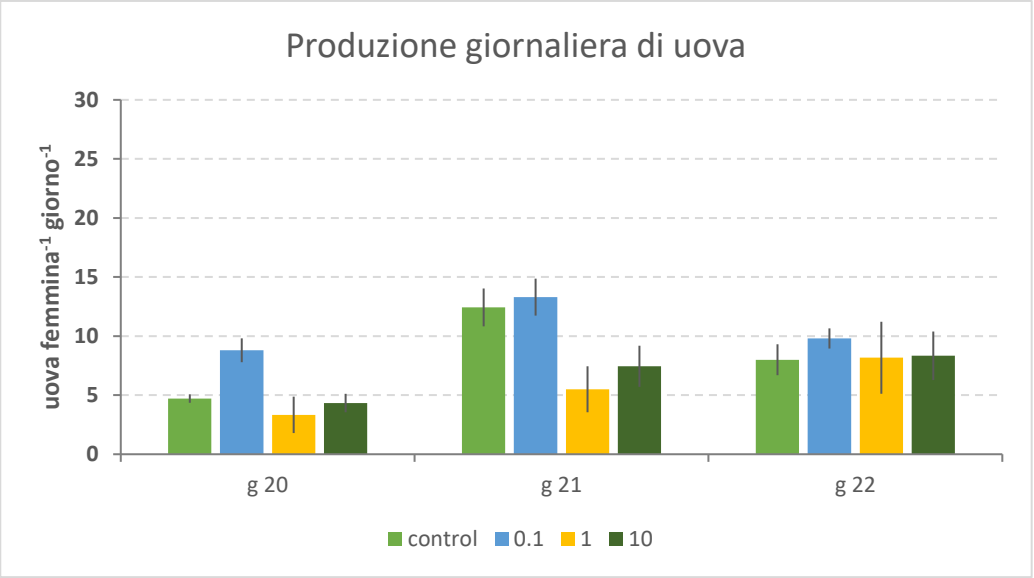


Fig. 14 – Produzione giornaliera di uova nei giorni 20, 21 e 22 per i quattro trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

Nel controllo, la produzione giornaliera di uova varia da un minimo di 4.7 ± 0.4 uova $femmina^{-1}$ $giorno^{-1}$, misurato il giorno 20, a un massimo di 12.4 ± 1.6 uova $femmina^{-1}$ $giorno^{-1}$ misurato il giorno 21. Invece, tra i trattamenti di BP-3, la più bassa produzione di uova è stata osservata nel trattamento 1 µg L^{-1} con 3.3 ± 1.5 uova $femmina^{-1}$ $giorno^{-1}$ rinvenute il giorno 20, mentre la massima produzione è stata rinvenuta nel trattamento 0.1 µg L^{-1} il giorno 21 con 13.3 ± 1.6 uova $femmina^{-1}$ $giorno^{-1}$. Complessivamente non è stato osservato alcun andamento particolare nella produzione giornaliera di uova nei quattro trattamenti durante i tre giorni di osservazione.

Analogamente alla produzione di uova, anche la produzione giornaliera di pellet (Fig. 15) non mostra un andamento specifico nelle 72h di esposizione individuale.

Nel controllo, la produzione di pellet aumenta da 67.6 ± 11.4 pellet femmina^{-1} giorno^{-1}, misurati il giorno 20, a 99.6 ± 11.0 pellet femmina^{-1} giorno^{-1} il giorno 21, valore che si mantiene anche il giorno 22. Nei trattamenti di BP-3, il valore minimo di produzione di pellet è stato rilevato nel trattamento 10 µg L^{-1} con 47.4 ± 3.2 pellet femmina^{-1} giorno^{-1} rinvenuti il giorno 20, mentre il valore massimo nel trattamento 0.1 µg L^{-1} con 102.3 ± 10.1 pellet femmina^{-1} giorno^{-1}, rinvenuti il giorno 21.

Nell'Allegato G vengono riportate le medie giornaliere della produzione di uova e pellet per ciascun trattamento.

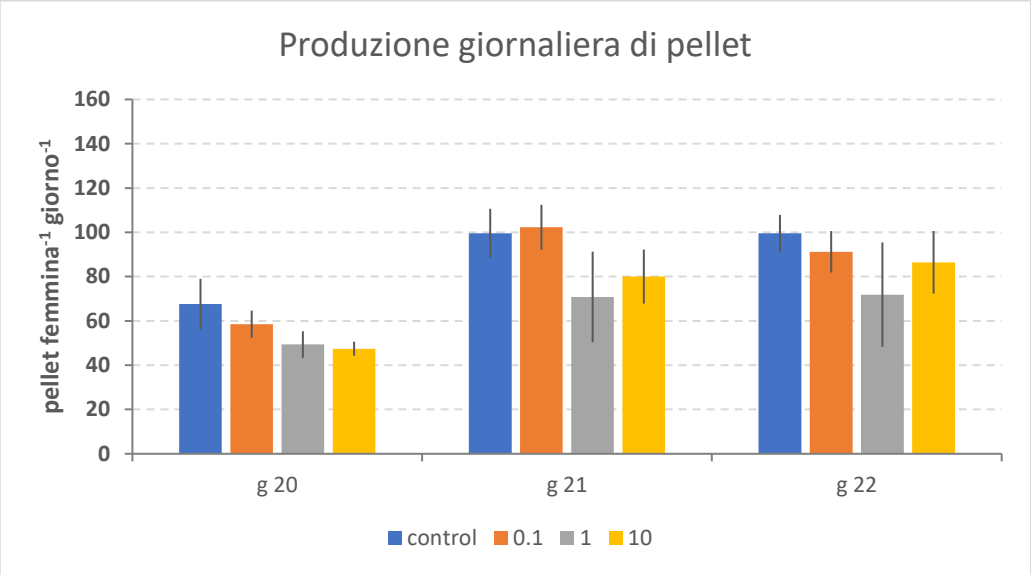


Fig. 15 – Produzione giornaliera di pellet nei giorni 20, 21 e 22 per i cinque trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

In Tab.3 viene riportata la media di produzione di uova e di pellet per femmina al giorno, calcolata sui tre giorni di osservazione.

Trattamenti	Produzione di uova (*uova femmina^{-1} giorno^{-1}*)	Produzione di pellet (*pellet femmina^{-1} giorno^{-1}*)
Controllo	8.4 ± 0.9	88.9 ± 8.5
0.1 µg L^{-1}	10.6 ± 0.8	84.0 ± 7.0
1 µg L^{-1}	5.7 ± 1.8	64.0 ± 15.2
10 µg L^{-1}	6.7 ± 1.4	71.3 ± 8.7

Tab.3 – Valori di produzione di uova e pellet nei tre giorni di osservazione, riportati come media ± errore standard.

L'analisi statistica effettuata sulla produzione di uova ha riscontrato una differenza significativa tra i trattamenti (ANOVA a una via: $F = 3.32$, $p = 0.034$). Tale differenza, tuttavia, è stata rilevata tra i trattamenti 0.1 e 1 µg L^{-1} (test di Tukey: $p = 0.043$), mentre nessun trattamento risulta essere diverso dal controllo. In Fig. 16 viene riportato il grafico relativo alla produzione media di uova nelle 72 h di esposizione.

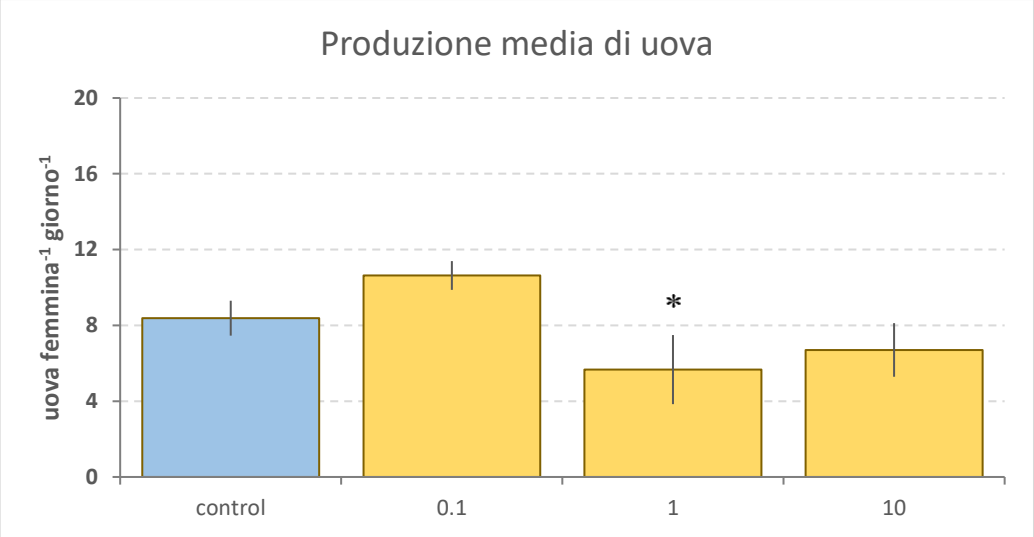


Fig. 16 – Produzione media di uova dal giorno 20 al giorno 22, per i quattro trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard e l'asterisco indica il trattamento significativamente differente a seguito di ANOVA a una via e test di Tukey ($p < 0.05$).

Riguardo alla produzione media di pellet (Fig. 17), l'analisi statistica non ha rilevato differenze significative tra i trattamenti (ANOVA a una via: $F = 1.30$, $p = 0.291$).
I grafici in Fig. 16 e in Fig. 17 fanno riferimento ai dati riportati in Tab.3.

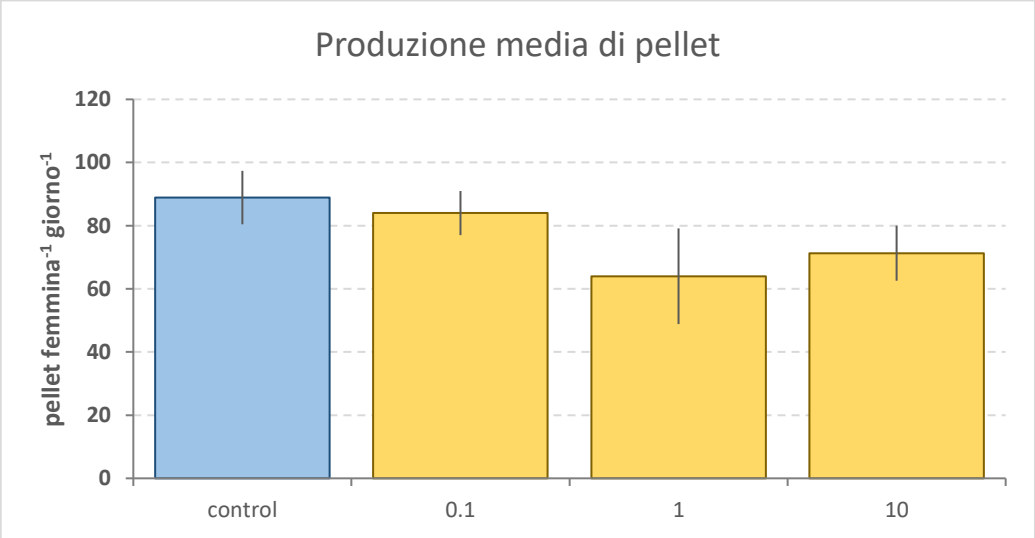


Fig. 17 – Produzione media di pellet dal giorno 20 al giorno 22, per i quattro trattamenti allestiti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

Nel test di sviluppo larvale effettuato sulla generazione F_1, non sono stati rilevati effetti di BP-3 sul tasso di schiusa H e l'analisi statistica non ha riscontrato differenze significative tra i trattamenti (ANOVA a una via: $F = 0.04$, $p = 0.989$), che hanno presentato un'elevata capacità di schiusa, con una media di 96% di uova schiuse.

Per il tasso di mortalità larvale ELS_m, l'analisi statistica ha evidenziato una differenza significativa tra i trattamenti (ANOVA a una via: $F = 3.26$, $p = 0.043$) che, tramite il test di Tukey ($p = 0.032$) è stata individuata tra i trattamenti 0.1 e 1 µg L^{-1}, che presentano rispettivamente una mortalità larvale di 12% e 42%. Tuttavia, non sono state rilevate differenze tra i trattamenti di BP-3 e il controllo.

Per il tasso di sviluppo larvale LDR, tutti i trattamenti di BP-3 hanno mostrato un netto ritardo nello sviluppo rispetto al controllo e l'analisi statistica conferma la presenza di differenze significative tra i trattamenti (ANOVA a una via: $F = 29.37$, $p < 0.001$) che il test di Tukey ($p < 0.001$) riscontra tra il controllo e ciascun trattamento di BP-3, i quali però non differiscono tra loro.

In particolare, i trattamenti di BP-3 presentano una percentuale di copepoditi (CI) inferiore al 30% rispetto ai copepoditi rinvenuti nel controllo e la percentuale di inibizione dello sviluppo osservata per i trattamenti 0.1 e 1 µg L^{-1} risulta rispettivamente di 80% e 82%, mentre per il trattamento 10 µg L^{-1} è di 68%. Viene dunque osservato un effetto significativo di BP-3 sulla capacità di sviluppo degli organismi che, pur non venendo esposti direttamente al contaminante, risentono dell'esposizione effettuata sui genitori, a partire dalla più bassa concentrazione testata (0.1 µg L^{-1}).

Di seguito (Fig. 18) si riportano i grafici con i risultati del test per i parametri H, ELS_s e LDR. È stato scelto di riportare il grafico del tasso di sopravvivenza larvale ELS_s, invece di ELS_m, per comodità nella visualizzazione, mentre nell'Allegato G vengono riportati i dati relativi al numero di uova, naupli e copepoditi rinvenuti durante il test.

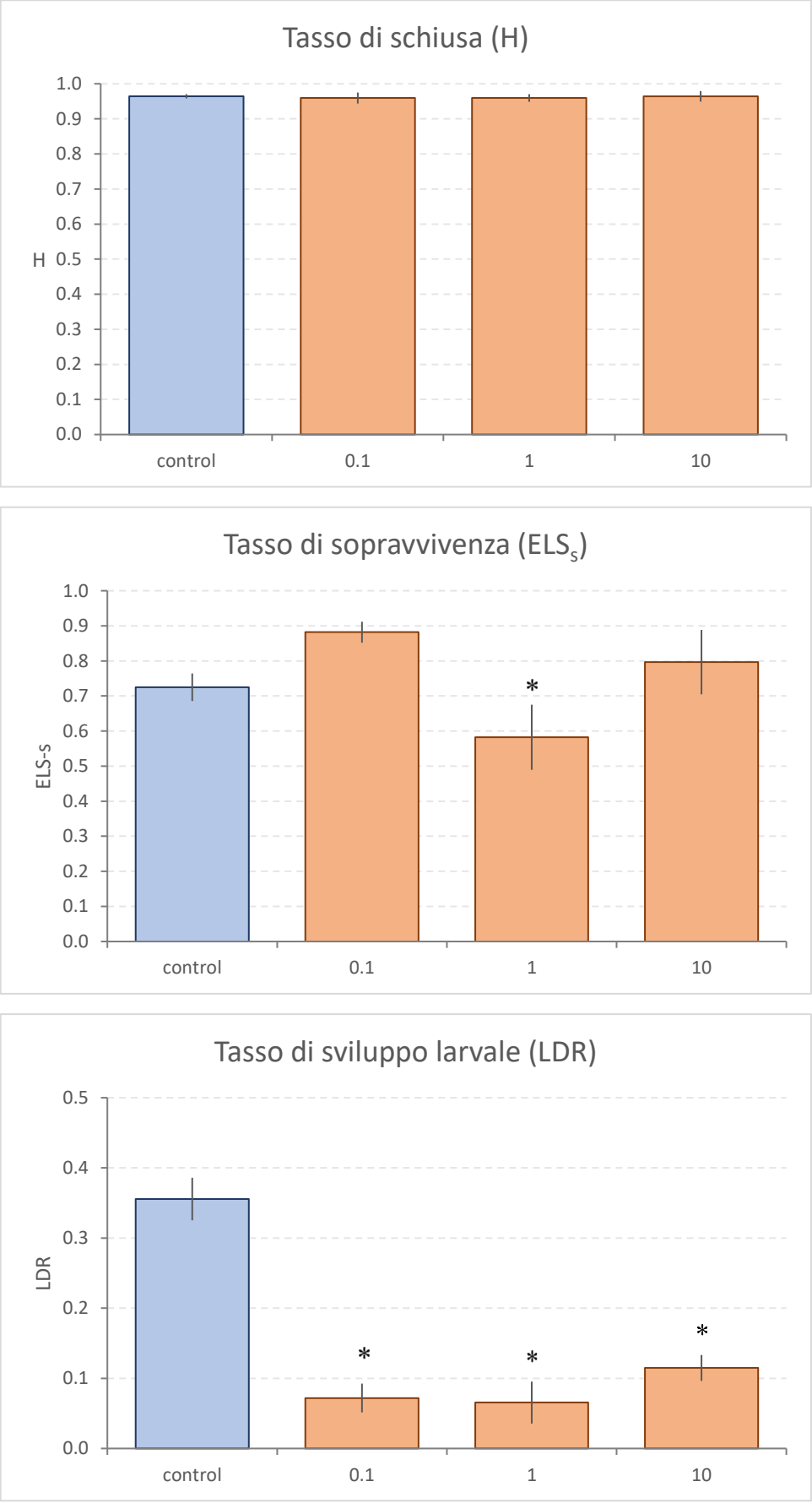


Fig.18 – Risultati del test LDR su generazione F_1: tasso di schiusa H (in alto), tassi di sopravvivenza ELSs (in mezzo), tasso di sviluppo larvale LDR (in basso). Le barre di errore rappresentano l'errore standard e gli asterischi indicano i trattamenti significativamente differenti a seguito di ANOVA a una via e test di Tukey ($p < 0.05$).

4. Discussione dei dati

Nel presente lavoro, lo studio degli effetti di BP-3 sul copepode *A. tonsa* è stato impostato nell'ottica di ottenere informazioni sulle risposte della specie in relazione ad alcuni tratti caratteristici del suo ciclo vitale, come lo sviluppo larvale e la capacità riproduttiva, a fronte di un'esposizione a BP-3 che simula le condizioni di esposizione rinvenute in ambiente. Sono stati dunque effettuati tre test di tossicità che prevedono sia tempi di esposizione diversi sia l'analisi di diversi endpoint che, complessivamente, consentono lo studio degli effetti di BP-3 sull'intero ciclo vitale della specie test, giungendo fino alla valutazione degli effetti transgenerazionali.

4.1 Test di sviluppo larvale

Il test LDR permette di valutare l'insorgere di effetti sui primi stadi di sviluppo, dunque sulle fasi più sensibili del ciclo vitale di *A. tonsa*, attraverso un'esposizione sub-cronica. I risultati del test LDR effettuato con BP-3 non hanno rilevato effetti significativi sui tre endpoint caratteristici del test (H, ELS_m, LDR) per alcuna delle concentrazioni di esposizione (0.1 – 1000 µg L^{-1}), suggerendo che, fino alla massima concentrazione testata (1000 µg L^{-1}), tale composto chimico non esercita un'azione tossica tale da compromettere i meccanismi fisiologici di regolazione dello sviluppo da cui dipendono la capacità di schiusa delle uova e i vari processi di muta e di metamorfosi.
Questo aspetto viene confermato anche dai successivi test di produzione uova e pellet e test cronico in cui, prolungando il periodo di esposizione a BP-3 oltre lo stadio di copepodite C-I (rispettivamente di 10 e 21 giorni), sono stati rinvenuti copepodi adulti, maturi sessualmente e capaci di riprodursi, indicando così che le concentrazioni di esposizione non hanno pregiudicato la capacità dei copepodi di svilupparsi e di raggiungere la maturità riproduttiva.

4.2 Test di produzione uova e pellet

Nel test di produzione di uova e pellet, l'esposizione al contaminante ricopre l'intero periodo dello sviluppo di *A. tonsa* fino al raggiungimento della maturità sessuale. Inoltre, la misurazione della produzione di uova consente di individuare effetti del contaminante sulla capacità riproduttiva della specie, in termini di inibizione o stimolazione del numero di uova prodotte, e effetti sul raggiungimento della maturità sessuale, desumibili dal giorno in cui inizia la produzione di uova. Il test effettuato con BP-3 non ha evidenziato la presenza di effetti significativi sulla produzione di uova negli individui esposti alle concentrazioni testate (0.1 – 100 µg L^{-1}), escludendo così la presenza di effetti inibitori, in quanto in tutti i trattamenti la produzione di uova è iniziata il giorno 11 e nessun

trattamento ha presentato una produzione significativamente minore rispetto al controllo, o di effetti stimolatori, poiché nessun trattamento ha mostrato un aumento significativo di produzione di uova rispetto al controllo. Di conseguenza, un'esposizione a BP-3 fino a 100 µg L^{-1} non causa alterazioni della resa riproduttiva di *A. tonsa*, evidenziando il fatto che, anche alla massima concentrazione testata, BP-3 non ha impedito la maturazione delle gonadi e i processi di oogenesi. Inoltre, eventuali meccanismi di difesa antiossidante e di detossificazione che possono essere stati attivati per il mantenimento dell'omeostasi non hanno compromesso l'allocazione dell'energia necessaria per la crescita e la riproduzione.

Non sono stati rilevati effetti neanche sulla produzione di pellet, indicando che l'alimentazione non viene compromessa e supporta la produzione di uova, come viene confermato anche dall'analisi di correlazione tra uova e pellet. Infatti, entrambe le produzioni di uova e pellet hanno mostrato un andamento crescente nei quattro giorni di osservazione, risultando in linea con il normale comportamento della specie.

Tuttavia, un effetto non osservato sulla riproduzione non esclude che vi possano essere conseguenze sulla qualità delle uova prodotte. Per questo si è proceduto con il test cronico che affianca allo studio della resa produttiva un test LDR sulla generazione F_1 per verificare i possibili effetti di BP-3 sulle uova nate da individui che hanno trascorso l'intero ciclo vitale in presenza del contaminante.

4.3 Test cronico

Nel test cronico, l'esposizione a BP-3 (0.1 – 10 µg L^{-1}) non ha comportato effetti sulla produzione di uova rispetto al controllo. Questo evidenzia che, nonostante il periodo di esposizione prolungato (21 giorni), BP-3 non comporta impedimenti nella crescita, nello sviluppo e nella riproduzione di *A. tonsa*, fino a concentrazioni di 10 µg L^{-1}. L'unica differenza significativa emersa dalle analisi statistiche riguarda la bassa produzione di uova alla concentrazione 1 µg L^{-1} che risulta essere significativamente inferiore alla produzione rinvenuta a 0.1 µg L^{-1}. Tale variabilità tra i trattamenti, per quanto non significativa rispetto al controllo, esprime la presenza di un basso livello di stress dovuto alla presenza del contaminante, a cui i copepodi possono aver reagito in maniera diversa a seconda delle concentrazioni testate. Si osservano così effetti differenti tra i trattamenti: a 0.1 µg L^{-1}, il lieve aumento nella produzione di uova potrebbe indicare un investimento nella riproduzione che, per quanto non significativo, risulta maggiore rispetto al controllo. Alla concentrazione 1 µg L^{-1}, invece, tale stress si manifesta con una minore produzione di uova a cui si affianca anche un'elevata mortalità degli individui durante i giorni di esposizione individuale. A 10 µg L^{-1}, infine, può subentrare un altro meccanismo che consente di compensare lo stress e porta ad una produzione di uova simile a quella osservata nel controllo. Tale variabilità suggerisce la presenza di un disturbo che,

pur non manifestandosi in maniera chiara, porta ad una rottura dell'omeostasi con risposte differenziate a seconda della concentrazione di esposizione.

In ogni caso, durante i giorni di osservazione non si è riscontrato un andamento particolare nella produzione di uova, dovuto probabilmente al fatto che, avendo oltrepassato la fase di crescita iniziale nella produzione di uova immediatamente successiva al raggiungimento della maturità ed un picco di produzione solitamente riscontrabile intorno al giorno 13 e 14, il tasso riproduttivo ha raggiunto un livello costante in cui si possono osservare fluttuazioni casuali ma non significative. Anche per la produzione di pellet non sono emersi effetti significativi, indicando che non vi sono differenze nel tasso di alimentazione.

Nel test LDR effettuato sulla generazione F_1, le uova prodotte dagli individui esposti nel test cronico vengono lasciate sviluppare nel medium di coltura in assenza del contaminante, in quanto l'obiettivo del test riguarda l'individuazione di eventuali effetti transgenerazionali sulla qualità della prole a seguito dell'esposizione a BP-3 dei genitori. I risultati del test non hanno riscontrato effetti significativi sulla capacità di schiusa, mentre per il tasso di mortalità è presente una differenza significativa tra i trattamenti 0.1 e 1 $\mu g\ L^{-1}$, con una maggiore percentuale di mortalità a 1 $\mu g\ L^{-1}$. Tale situazione sembra richiamare la differenza significativa osservata nel test cronico per la bassa produzione di uova a 1 $\mu g\ L^{-1}$. La presenza di un effetto relativo alla sopravvivenza per la generazione F_1, per quanto non significativo rispetto al controllo, può confermare il fatto che a 1 $\mu g\ L^{-1}$ i genitori abbiano affrontato una condizione di stress tale da compromettere sia la quantità sia la qualità delle uova prodotte.

Invece, è emerso un marcato effetto sulla capacità di sviluppo larvale: infatti, è stata osservata una significativa riduzione del tasso LDR a partire dalla più bassa concentrazione testata (0.1 $\mu g\ L^{-1}$) e comune a tutti i trattamenti. Dunque, si può presumere che l'esposizione a BP-3 durante il test cronico sia stata sufficientemente bassa da non compromettere lo sviluppo e la capacità riproduttiva degli individui della generazione F_0, in quanto la produzione di uova non viene alterata e le uova prodotte risultano vitali, con buoni tassi di schiusa e di sopravvivenza, ma sia stata sufficiente per comportare un effetto deleterio sulla capacità di sviluppo dei primi stadi larvali, che hanno mostrato un netto ritardo nell'effettuare la metamorfosi da nauplio a copepodite. Questo aspetto può essere giustificato dal fatto che l'endpoint LDR risulta essere un parametro maggiormente sensibile rispetto alla capacità di schiusa e al tasso di mortalità, per via dei costi energetici aggiuntivi della metamorfosi rispetto al normale mantenimento dell'individuo (Picone et al., 2023).

Tuttavia, determinare le cause dell'effetto tossico di BP-3 osservato sulla prole di *A. tonsa* risulta complesso a causa dei molteplici meccanismi di tossicità con cui i filtri UV organici possono alterare vari processi biochimici e fisiologici negli invertebrati. Una delle possibili cause può essere attribuita

alla produzione di uova di bassa qualità, in termini di sufficienti riserve energetiche necessarie per lo sviluppo della larva, da parte dei genitori esposti a BP-3. Infatti, considerando che l'esposizione a BP-3 può indurre processi di biotrasformazione di fase I e fase II e generare stress ossidativo, i genitori possono aver allocato una minore quantità di riserve lipidiche nelle uova a fronte dei maggiori costi energetici legati alla detossificazione ed eliminazione del contaminante: questo può aver portato ad una minore energia disponibile da destinare al sostentamento dei giovani naupli.

Un'altra causa può essere legata al trasferimento materno nelle uova di BP-3 e di suoi metaboliti associati ai lipidi, durante la vitellogenesi (Niehoff, 2007). Infatti, BP-3 è un composto lipofilico ed è probabile che a seguito dell'assimilazione si associ alle componenti lipidiche dell'organismo. In questo modo, i naupli, che nei primi stadi di sviluppo si nutrono quasi esclusivamente delle riserve lipidiche ottenute dalla madre (Landry, 1983), possono entrare direttamente in contatto con il contaminante associato ai lipidi: questo diventa disponibile durante l'alimentazione e può compromettere lo sviluppo, impedendo una corretta allocazione di energia per la crescita e/o provocando effetti tossici su tessuti o organi.

Questi aspetti possono inoltre spiegare la differenza con i risultati del test LDR condotto sulla generazione parentale. Infatti, le uova utilizzate nel test LDR su F_0, essendo prodotte in ambiente non contaminato, si presentano in una condizione migliore, in termini di quantità di riserve lipidiche allocate e di assenza di contaminanti, tale da non risentire dell'esposizione a BP-3, anche a concentrazioni elevate, durante la crescita e lo sviluppo. Nel test LDR su F_1, invece, le uova risultano di qualità inferiore e possono presentare già al loro interno un carico di contaminante sufficiente da alterare i normali processi di sviluppo. A tal proposito, le modalità in cui BP-3 può agire possono essere diverse e implicare target fisiologici differenti. Ad esempio, per contrastare la presenza del contaminante possibilmente ereditato dalla madre, si può verificare un maggiore investimento energetico per il mantenimento delle funzioni vitali, con i meccanismi di detossificazione e di difesa antiossidante, che può risultare in una minore energia disponibile per la crescita, rallentando così lo sviluppo larvale.

Negli invertebrati, alcuni degli effetti tossici di BP-3 sono legati alla sua capacità di generare stress ossidativo e di agire come interferente endocrino. Ad esempio, in uno studio condotto sul crostaceo cladocero *Daphnia magna* (Straus, 1820), in cui sono stati esaminati gli effetti dell'esposizione cronica di BP-3 (21 giorni a 0.17 $\mu g\ L^{-1}$) su due generazioni, è stato rilevato un aumento nella produzione dell'enzima antiossidante CAT nella generazione figlia, con conseguenti ripercussioni negative a livello individuale nell'efficienza riproduttiva, confermando sia la possibile attività di BP-3 nel generare stress ossidativo sia la possibilità di BP-3 di dare adito a effetti transgenerazionali (de Paula et al., 2022).

Per quanto riguarda la possibile attività di BP-3 come interferente endocrino, alcuni studi hanno riscontrato la capacità di tale filtro UV di interferire nelle vie di segnalazione ormonale. Ad esempio, nei ditteri è stato osservato che BP-3 mima l'azione dell'ormone ecdisone, aumentando l'espressione dei geni codificanti per i recettori dell'ecdisone (EcR), con conseguenti effetti su sopravvivenza e sviluppo (Ozáez et al., 2014; Campos et al., 2019). Nello specifico, in *Chironomus riparius* l'esposizione a BP-3 ha compromesso lo sviluppo larvale nella generazione parentale e la schiusa e la sopravvivenza nella prole. Per quanto tali effetti non siano stati riscontrati nei test effettuati nel presente lavoro su *A. tonsa*, questi studi evidenziano la potenzialità di BP-3 di influenzare i meccanismi di regolazione ormonale, soprattutto in relazione alle vie di segnalazione degli ecdisteroidi. Nei copepodi, i geni codificanti per EcR vengono naturalmente up-regolati nei primi stadi di sviluppo, da N-II a C-II, sollecitati dagli eventi di muta e dalla metamorfosi (Hwang et al., 2010), dunque un'eventuale interferenza di BP-3, che mostra un'affinità per tali recettori, può portare a degli scompensi a livello di segnalazione ormonale, a cui può conseguire un effetto negativo durante lo sviluppo larvale.

Inoltre, anche in *D. magna* l'esposizione a BP-3 (21 giorni a 166 µg L^{-1}) ha comportato alterazioni nell'espressione dei geni correlati al sistema endocrino, con un aumento nell'espressione del gene codificante per la proteina USP, componente essenziale nel processo di segnalazione ormonale assieme a EcR (Lambert et al., 2021). Tale alterazione è stata collegata agli effetti osservati a livello individuale che hanno riguardato anomalie nello sviluppo nella generazione parentale e minori mobilità ed efficienza riproduttiva nella generazione F_1, nata da genitori esposti al contaminante.

Questi primi studi evidenziano la capacità di BP-3 di interferire nella regolazione endocrina di insetti e crostacei e l'effetto sullo sviluppo larvale nella prole di *A. tonsa* osservato nel presente lavoro può suggerire che anche nei copepodi BP-3 sia in grado di indurre di un'alterazione a livello ormonale. In ogni caso, determinare la presenza di un problema di interferenza endocrina è molto complesso e impone la necessità di affiancare ai saggi di tossicità analisi genetiche e di biomarker per riuscire ad identificare i possibili meccanismi di azione a livello biochimico e fisiologico di contaminanti emergenti come BP-3.

Il ritardo nello sviluppo larvale nella generazione F_1 di *A. tonsa* non prelude necessariamente ad una successiva mortalità dei naupli, ma può determinare un prolungamento del periodo di sviluppo che, al netto della durata complessiva del ciclo vitale, si traduce con un minor tempo disponibile per la riproduzione. Questo aspetto può implicare effetti negativi per le nuove generazioni, in termini di quantità e qualità della prole e, a livello di comunità, può comportare una riduzione nell'abbondanza della specie, con successive ricadute negative sull'intera catena trofica. Infatti, considerando il ruolo cruciale dei copepodi nelle reti trofiche marine, tale effetto negativo sulle popolazioni di specie come

A. tonsa può portare ad un'alterazione nella disponibilità di cibo per i livelli trofici superiori, come altri invertebrati e pesci planctivori (Picone et al., 2023). Inoltre, si può verificare un trasferimento del contaminante accumulato nei tessuti dei copepodi lungo la catena trofica, innescando così un potenziale processo di bioaccumulo che porterebbe ad esporre anche altri organismi agli effetti tossici di BP-3 e dei suoi metaboliti.

4.4 Sensibilità di *A. tonsa* rispetto ad altri invertebrati

Effettuando un confronto in letteratura con altri studi che hanno indagato la tossicità di BP-3 nei crostacei, si osserva che BP-3 genera un effetto tossico acuto a concentrazioni di esposizione elevate, generalmente superiori a 1000 µg L^{-1}, sia in specie marine sia in specie di acqua dolce. Ad esempio, test acuti effettuati su *Artemia salina* riportano una concentrazione di effetto sul 50% di organismi esposti (EC_{50}) di 2530 µg L^{-1} (de Paula et al., 2022), mentre Thorel et al. (2020) non hanno riscontrato alcun effetto fino alla massima concentrazione testata (2000 µg L^{-1}). Per *A. franciscana* (Kellogg, 1906) la concentrazione che ha comportato la mortalità nel 50% degli organismi (LC_{50}) che è stata ottenuta è di 5270 µg L^{-1} (Marcin & Aleksander, 2023), mentre il misidaceo *Siriella armata* (Milne Edwards, 1837) è l'unica specie che ha riportato un effetto a concentrazioni inferiori a 1000 µg L^{-1}, con una LC_{50} di 710,8 µg L^{-1} (Paredes et al., 2014).
Per le specie d'acqua dolce, test acuti condotti su *D. magna*, rilevano EC_{50} comprese tra 1200 e 1720 µg L^{-1} (Boyd et al., 2021; Sieratowicz et al., 2011; de Paula et al., 2022), mentre in *D. carinata* (King, 1853) è stata osservata una LC_{50} di 2180 µg L^{-1} (Du et al., 2019). Pur tenendo in considerazione le opportune differenze tra gli organismi indicatori e la tipologia di test effettuato, quanto emerso nel presente lavoro su *A. tonsa*, relativamente al test LDR su F_0 in cui non sono stati rilevati effetti significativi fino a 1000 µg L^{-1}, si rivela essere in linea con i risultati ottenuti con altri crostacei e suggerisce che un eventuale effetto tossico acuto nei copepodi si possa verificare a concentrazioni superiori.

Per quanto riguarda il confronto con altri invertebrati marini, è interessante considerare i dati relativi alla tossicità di BP-3 nei coralli. Infatti, pur essendo specie filogeneticamente molto distanti, i coralli sono i primi organismi in cui è stato osservato un effetto tossico riconducibile all'esposizione dei filtri UV, destando così l'interesse della comunità scientifica per le conseguenze della diffusione in ambiente di tali composti e in particolare di BP-3.

Le concentrazioni di effetto rinvenute in diversi studi si distribuiscono in un ampio intervallo, mediamente tra 1 µg L^{-1} fino a oltre 1000 µg L^{-1} (Fig. 19), a seconda della tipologia di test, della specie considerata e degli endpoint analizzati, con gli effetti più frequenti rinvenuti a concentrazioni superiori a 100 µg L^{-1} (Mitchelmore et al., 2021; Miller et al., 2022). Tali effetti riguardano diversi endpoint come la concentrazione di zooxantelle, l'alterazione comportamentale nei polipi, lo sbiancamento, la capacità di insediamento delle larve e la mortalità, evidenziando così la potenzialità dei filtri UV, e soprattutto di BP-3, di nuocere alla salute dei coralli.

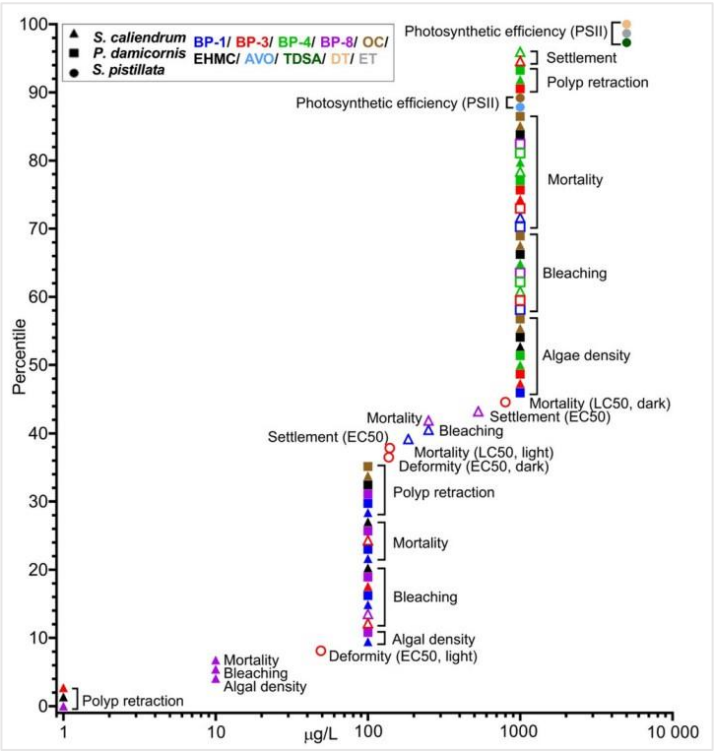


Fig. 19 – Distribuzione cumulativa percentuale degli endpoint studiati nei coralli per i filtri UV. Gli endpoint riportati sono concentrazioni di non effetto (NOEC), tranne quando diversamente specificato. La distribuzione indica la probabilità che l'endpoint cada al di sotto della concentrazione riportata in asse-x. (Fonte: Mitchelmore et al., 2021)

Legenda: la forma del punto indica la specie, il colore indica il filtro UV e se il punto è vuoto, l'endpoint si riferisce a stadi larvali, altrimenti all'adulto.

Queste evidenze hanno suscitato grande preoccupazione per la presenza di filtri UV nelle aree vicino alle barriere coralline, portando in alcuni Paesi all'implementazione di bandi relativi all'utilizzo di PCP contenenti alcuni filtri UV, tra cui BP-3, nel tentativo di limitarne la diffusione derivante dall'intensa attività turistica (Khanna & Singh, 2023; Ouchene et al., 2019).

Le concentrazioni di effetto rilevate nel test cronico di *A. tonsa* risultano confrontabili, se non inferiori, a quelle osservate nei coralli, essendo rinvenute tra 0.1 e 10 µg L^{-1}. Questo risultato evidenzia come gli impatti negativi della diffusione dei filtri UV in ambiente non riguardino solo le barriere coralline ma rappresentino un problema ambientale di cui tenere conto anche in altri ecosistemi. Infatti, i copepodi, con la loro ampia distribuzione nelle acque marino-costiere, rappresentano una delle componenti biologiche potenzialmente più esposte ai filtri UV e, vista la loro importanza nelle reti trofiche marine, l'eventuale insorgere di un effetto negativo a livello di popolazione può portare a conseguenze deleterie ai livelli trofici più elevati (i.e., comunità ed ecosistema).

Tuttavia, il fatto che BP-3 possa generare un effetto tossico acuto ad elevate concentrazioni di esposizione ha portato alcuni autori a mettere in discussione l'effettiva criticità della presenza di filtri UV in ambiente, poiché le concentrazioni più frequentemente rinvenute (tra ng L^{-1} e µg L^{-1}) sono

molto inferiori rispetto alle concentrazioni di effetto riscontrate nei test di laboratorio (Narla & Lim, 2020; Wheate, 2022). Per quanto in letteratura ci siano diversi studi che riportano elevate concentrazioni di effetto di BP-3 in diverse specie test, è pur vero che si osserva anche una certa eterogeneità nelle risposte degli organismi studiati alle varie concentrazioni di esposizione, che dipende dalla sensibilità della specie test a questi contaminanti e dagli endpoint analizzati. Inoltre, studiando gli effetti a lungo termine tramite test cronici e multigenerazionali, in cui si considerano endpoint più sensibili, relativi allo sviluppo e alla riproduzione, si può osservare come le concentrazioni a cui si riscontra un effetto tossico si abbassino notevolmente. Ad esempio, sempre considerando studi effettuati sui crostacei, in un test cronico con *D. magna*, già un'esposizione a 166 $\mu g\ L^{-1}$ di BP-3 ha portato ad anomalie nello sviluppo nella prima generazione esposta e ha compromesso la capacità riproduttiva nella generazione F_1 (Lambert et al., 2021). In un altro studio condotto su *D. magna*, pur non rilevando effetti significativi nella generazione parentale, sono stati osservati effetti negativi sulla riproduzione nella generazione F_1 a seguito di un'esposizione a BP-3 a 0.17 $\mu g\ L^{-1}$ (de Paula et al., 2022). In *D. carinata*, invece, l'esposizione cronica a 0.1 $\mu g\ L^{-1}$ di BP-3 ha alterato il normale sviluppo degli individui, provocando un ritardo nella prima muta (Du et al., 2019). Questi studi suggeriscono dunque la potenzialità di BP-3 di generare un'interferenza nella crescita e nella riproduzione degli organismi esposti anche a basse concentrazioni (de Paula et al., 2022).

Anche quanto osservato nel presente lavoro su *A. tonsa* rivela che un'esposizione cronica a BP-3 può indurre un effetto tossico a basse concentrazioni: infatti, dai risultati ottenuti nei tre test di tossicità si nota come BP-3, pur non inducendo alcun effetto tossico significativo sulla prima generazione di *A. tonsa*, né in termini di capacità di crescita e sviluppo né di capacità riproduttiva, può compromettere notevolmente il normale sviluppo della prole nata dalla generazione esposta, fin dalla più bassa concentrazione testata (0.1 $\mu g\ L^{-1}$). Questo aspetto evidenzia che anche l'esposizione a concentrazioni che sono comunemente rinvenute in ambiente (0.1 – 10 $\mu g\ L^{-1}$) in corrispondenza di spiagge altamente frequentate, nelle acque adiacenti a città costiere e in aree vicino a barriere coralline (Cadena-Aizaga et al., 2022; Tsui et al., 2014; Bargar et al., 2015; Downs et al., 2016), può comportare un rischio significativo di effetti avversi per le popolazioni naturali di copepodi marini.

Di seguito, si riporta una tabella di riepilogo (Tab. 4) con i dati di tossicità di BP-3 rilevati in altri crostacei.

Specie	Tipo di test	Endpoint misurato	Parametro	Concentrazione effetto ($\mu g\ L^{-1}$)	Fonte	Note
Artemia franciscana	acuto	mortalità	48h - LC_{50}	5270	Marcin & Aleksander, 2023	
Artemia salina	acuto	immobilizzazione	48h - EC_{50}	2530	de Paula et al., 2022	
		mortalità		fino a 2000 non tossico	Thorel et al., 2020	
Siriella armata	acuto	mortalità	96h - LC_{50}	710,8	Paredes et al., 2014	
Daphnia carinata	acuto	mortalità	24h - LC_{50}	2180	Du et al., 2019	
	cronico	crescita	21d - sviluppo	0.1		Ritardo nella prima muta
Daphnia magna	acuto	immobilizzazione	48h - EC_{50}	1200	Boyd et al., 2021	
				1670	Sieratowicz et al., 2011	
				1720	de Paula et al., 2022	
	cronico	capacità riproduttiva	21d - riproduzione in F_1	0.17	de Paula et al., 2022	Ritardo nella riproduzione
		numerosità prole				Minor numero di neonati
		anomalie sviluppo	21d - sviluppo	166	Lambert et al., 2021	Presenza di spine ricurve
		mobilità	21d - sviluppo e riproduzione in F_1	166		Minore velocità nel nuoto
		lunghezza corporea				Riduzione lunghezza corporea
		capacità riproduttiva				Ritardo nella riproduzione e minor numero di neonati

Tab. 4 – Tabella di riepilogo dei dati di tossicità di BP-3 rilevati in altri crostacei. Nella colonna "Parametro" si riporta la durata dell'esposizione, in ore (h) o in giorni (d), e il parametro considerato (concentrazioni di effetto per i test acuti e caratteristiche del ciclo vitale per i test cronici). Nelle "Note" si riporta la descrizione degli effetti riscontrati nei test cronici.

5. Conclusione

L'ampia diffusione dei filtri UV in ambiente e le prime evidenze scientifiche dei loro impatti negativi su diversi organismi ed ecosistemi marini hanno portato la comunità scientifica ad approfondire lo studio di questi nuovi contaminanti emergenti, rivelandone le potenziali criticità relative ad effetti negativi come la produzione di ROS, l'interferenza endocrina e il bioaccumulo. In particolare, BP-3 è il filtro UV che ha destato maggior interesse per il suo ampio utilizzo nelle creme solari e nei prodotti cosmetici e per gli effetti negativi riscontrati nei coralli. A fronte delle scarse informazioni sugli effetti cronici dell'esposizione a concentrazioni ambientali di BP-3 e della mancanza di conoscenze sugli effetti di BP-3 nei copepodi, nel presente lavoro è stato effettuato uno studio degli effetti sub-cronici e cronici di BP-3 su diversi tratti caratteristici del ciclo vitale di *A. tonsa*, un copepode calanoide molto diffuso negli ambienti marino-costieri e ampiamente utilizzato come organismo indicatore nei saggi di ecotossicità.

I risultati dei tre test di tossicità effettuati evidenziano come BP-3 non induca effetti significativi nella generazione parentale di *A. tonsa* alle concentrazioni testate (0.1 – 1000 $\mu g\ L^{-1}$). Nel test LDR, l'esposizione a BP-3 non causa effetti significativi su sopravvivenza e sviluppo larvale fino a una concentrazione di 1000 $\mu g\ L^{-1}$. Nel test di produzione uova e pellet e nel test cronico non si rilevano alterazioni significative nella produzione di uova e di pellet fino a 100 $\mu g\ L^{-1}$ e fino a 10 $\mu g\ L^{-1}$, rispettivamente. Tuttavia, emerge un significativo effetto tossico sulla generazione F_1, in quanto le uova prodotte nel test cronico, lasciate sviluppare in un medium non contaminato, hanno mostrato un'inibizione dello sviluppo larvale fin dalla più bassa concentrazione testata (0.1 $\mu g\ L^{-1}$). Tale effetto può essere riconducibile alla bassa qualità delle uova prodotte dagli individui esposti a BP-3, sia in termini di insufficienti riserve energetiche necessarie allo sviluppo sia in termini di un possibile trasferimento materno del contaminante nelle uova. Sulla base degli studi rinvenuti in letteratura, l'effetto sullo sviluppo larvale può essere sintomo di un'insufficiente energia disponibile per la crescita a causa dell'investimento energetico nei processi di detossificazione e può suggerire la capacità di BP-3 di generare stress ossidativo o di agire come interferente endocrino. Tuttavia, per comprendere nel dettaglio i meccanismi di azione di BP-3 sono necessari ulteriori studi che possano affiancare ai test di tossicità anche analisi genetiche e di biomarker.

Dunque, i risultati del presente lavoro evidenziano che anche basse concentrazioni di esposizione a BP-3 possono indurre un effetto tossico in *A. tonsa*, suggerendo così anche la possibilità di tale filtro UV di esercitare un impatto negativo sulle popolazioni di copepodi e, conseguentemente, sulle reti trofiche marine. Questo aspetto indica, inoltre, che la presenza di BP-3 lungo le aree costiere può comportare un problema ambientale anche in ecosistemi diversi dalle barriere coralline tropicali e

subtropicali che per primi sono stati identificati come i sistemi a maggiore rischio per l'uso di BP-3 e di altri filtri UV nelle creme solari.

Da qui emerge la necessità di prestare maggiore attenzione al tema della diffusione dei filtri UV in ambiente sia da parte del pubblico, con la scelta di prodotti contenenti altri filtri UV considerati meno impattanti, sia da parte delle istituzioni nel considerare restrizioni più diffuse nell'utilizzo nelle zone costiere di PCP contenenti BP-3.

Inoltre, è necessario approfondire la conoscenza delle concentrazioni ambientali di BP-3 e di altri filtri UV, includendo nei programmi di monitoraggio anche analisi specifiche sui filtri UV rinvenuti in diverse matrici ambientali, per permettere una valutazione più approfondita delle criticità relative alla presenza di questi composti in ambiente. A tal fine si può sviluppare anche una ricerca indirizzata allo studio degli effetti relativi ad un'esposizione combinata di più filtri UV, condizione più frequentemente rinvenuta in ambiente, che può comportare l'insorgere di effetti sinergici o antagonisti negli organismi esposti e far variare così la tossicità dei composti studiati.

Infine, come osservato anche nel presente lavoro, per lo studio della tossicità di contaminanti emergenti come i filtri UV, si evidenzia l'importanza di effettuare test cronici e multigenerazionali, in quanto implicano non solo un'esposizione prolungata a basse concentrazioni, condizione più frequente in ambiente rispetto all'esposizione acuta, ma anche l'utilizzo di endpoint sub-letali che consentono di individuare effetti su tratti caratteristici delle specie, come lo sviluppo e la riproduzione, che hanno un ruolo rilevante per la sopravvivenza a lungo termine della popolazione e, quindi, per la salute della comunità e dell'ecosistema.

Bibliografia

Almeida S. dos S., Rocha T.L., Qualhato G., Oliveira L. de A.R., Amaral C.L. do, Conceição E.C. da, Sabóia-Morais S.M.T. de, Bailão E.F.L.C. 2019 Acute exposure to environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induced genotoxicity in Poecilia reticulata. *Aquat. Toxicol.* **216**, 105293. (doi:10.1016/j.aquatox.2019.105293)

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. (doi:10.1002/etc.5620201222)

ASTM, 2004. Standard Guide for Conducting Renewal Microplate-Based Life-Cycle Toxicity Tests with a Marine Meiobenthic Copepod. American Society for Testing and Materials (E2317-04).

Balázs A., Krifaton C., Orosz I., Szoboszlay S., Kovács R., Csenki Z., Urbányi B., Kriszt B. 2016 Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **131**, 45–53. (doi:10.1016/j.ecoenv.2016.04.037)

Bargar T.A., Alvarez D.A., Garrison V.H. 2015 Synthetic ultraviolet light filtering chemical contamination of coastal waters of Virgin Islands national park, St. John, U.S. Virgin Islands. *Mar. Pollut. Bull.* **101**, 193–199. (doi:10.1016/j.marpolbul.2015.10.077)

Beaugrand G., Brander K.M., Lindley J.A., Souissi S., Reid P.C. 2003 Plankton effect on cod recruitment in the North Sea. *Nature* **426**, 661–664. (doi:10.1038/nature02164)

Bernot J.P., Boxshall G.A., Crandall K.A. 2021 A synthesis tree of the Copepoda: Integrating phylogenetic and taxonomic data reveals multiple origins of parasitism. *PeerJ* **9**. (doi:10.7717/peerj.12034)

Blüthgen N., Zucchi S., Fent K. 2012 Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (Danio rerio). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **263**, 184–194. (doi:10.1016/j.taap.2012.06.008)

Boyd A., Stewart C.B., Philibert D.A., How Z.T., El-Din M.G., Tierney K.B., Blewett T.A. 2021 A burning issue: The effect of organic ultraviolet filter exposure on the behaviour and physiology of Daphnia magna. *Sci. Total Environ.* **750**, 141707. (doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141707)

Cadena-Aizaga M.I., Montesdeoca-Esponda S., Torres-Padrón M.E., Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodríguez J.J. 2020 Organic UV filters in marine environments: An update of analytical methodologies, occurrence and distribution. *Trends Environ. Anal. Chem.* **25**. (doi:10.1016/j.teac.2019.e00079)

Cadena-Aizaga M.I., Montesdeoca-Esponda S., Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodríguez J.J. 2022 Occurrence and environmental hazard of organic UV filters in seawater and wastewater from Gran Canaria Island (Canary Islands, Spain). *Environ. Pollut.* **300**. (doi:10.1016/j.envpol.2022.118843)

Calafat A.M., Wong L.Y., Ye X., Reidy J.A., Needham L.L. 2008 Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* **116**, 893–897. (doi:10.1289/ehp.11269)

Caloni S., Durazzano T., Franci G., Marsili L. 2021 Sunscreens' uv filters risk for coastal marine environment biodiversity: A review. *Diversity* **13**, 1–18. (doi:10.3390/d13080374)

Camatti E., Pansera M., Bergamasco A. 2019 The copepod acartia tonsa Dana in a microtidal mediterranean Lagoon: History of a successful invasion. *Water (Switzerland)* **11**, 1200. (doi:10.3390/w11061200)

Campos D., Silva A.R.R., Loureiro S., Grabicová K., Staňová A.V., Soares A.M.V.M., Pestana J.L.T. 2019 Two-generational effects of Benzophenone-3 on the aquatic midge Chironomus riparius. *Sci. Total Environ.* **669**, 983–990. (doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.023)

Carve M., Nugegoda D., Allinson G., Shimeta J. 2021 A systematic review and ecological risk assessment for organic ultraviolet filters in aquatic environments. *Environ. Pollut.* **268**, 115894. (doi:10.1016/j.envpol.2020.115894)

Cervetto G., Gaudy R., Pagano M. 1999 Influence of salinity on the distribution of Acartia tonsa (Copepoda, Calanoida). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **239**, 33–45.

Chaves Lopes F., Rosa de Castro M., Caldas Barbosa S., Primel E.G., de Martinez Gaspar Martins C. 2020 Effect of the UV filter, Benzophenone-3, on biomarkers of the yellow clam (Amarilladesma mactroides) under different pH conditions. *Mar. Pollut. Bull.* **158**. (doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111401)

Chen T.H., Wu Y.T., Ding W.H. 2016 UV-filter benzophenone-3 inhibits agonistic behavior in male Siamese fighting fish (Betta splendens). *Ecotoxicology* **25**, 302–309. (doi:10.1007/s10646-015-1588-4)

Chisvert A., Salvador A., 2007 UV Filters in Sunscreens and other Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods. In: Chisvert A., Salvador, A. (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products, Analytical Methods*. Elsevier, pp. 83–120.

Cocci P., Mosconi G., Palermo F.A. 2020 Sunscreen active ingredients in loggerhead turtles (Caretta caretta) and their relation to molecular markers of inflammation, oxidative stress and hormonal activity in wild populations. *Mar. Pollut. Bull.* **153**, 111012. (doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111012)

Coronado M., De Haro H., Deng X., Rempel M.A., Lavado R., Schlenk D. 2008 Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish. *Aquat. Toxicol.* **90**, 182–187. (doi:10.1016/j.aquatox.2008.08.018)

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)

Cunha S.C. *et al.* 2018 UV-filters and musk fragrances in seafood commercialized in Europe Union: Occurrence, risk and exposure assessment. *Environ. Res.* **161**, 399–408. (doi:10.1016/j.envres.2017.11.015)

Danovaro R., Bongiorni L., Corinaldesi C., Giovannelli D., Damiani E., Astolfi P., Greci L., Pusceddu A. 2008 Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environ. Health Perspect.* **116**, 441–447. (doi:10.1289/ehp.10966)

de Paula V. de C.S., Gomes M.F., Martins L.R.R., Yamamoto F.Y., de Freitas A.M. 2022 Acute toxicity characterization of organic UV-filters and chronic exposure revealing multigenerational effects in DAPHNIA MAGNA. *Ecotoxicology* **31**, 1413–1425. (doi:10.1007/s10646-022-02598-4)

Díaz-Cruz M.S., Llorca M., Barceló D. 2008 Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **27**, 873–887. (doi:10.1016/j.trac.2008.08.012)

Díaz-Cruz M.S., Gago-Ferrero P., Llorca M., Barceló D. 2012 Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 2325–2333. (doi:10.1007/s00216-011-5560-8)

Downs C.A. Kramarsky-Winter E., Segal R. *et al.* 2016 Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV Filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on Coral Planulae and Cultured Primary Cells and Its Environmental Contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **70**, 265–288. (doi:10.1007/s00244-015-0227-7)

Drillet G., Jepsen P.M., Højgaard J.K., Jørgensen N.O.G., Hansen B.W. 2008 Strain-specific vital rates in four Acartia tonsa cultures II: Life history traits and biochemical contents of eggs and adults. *Aquaculture* **279**, 47–54. (doi:10.1016/j.aquaculture.2008.04.010)

Du J., Qv M., Li K., Yin X., Meng F., Yang J., Ma C. 2019 Impacts of benzophenone-type UV filters on cladoceran Daphnia carinata. *Limnology* **20**, 173–179. (doi:10.1007/s10201-018-0563-1)

EC 2009, Regolamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 30 Novembre 2009 sui prodotti cosmetici

EC 2022a, Regolamento (CE) N° 2022/1176 della Commissione del 7 luglio 2022 che modifica il regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'uso di determinati filtri UV nei prodotti cosmetici

EC 2022b, Decisione di esecuzione (UE) 2022/1307 della Commissione Europea del 22 luglio 2022

Fagervold S.K., Rodrigues A.S., Rohée C., Roe R., Bourrain M., Stien D., Lebaron P. 2019 Occurrence and Environmental Distribution of 5 UV Filters During the Summer Season in Different Water Bodies. *Water. Air. Soil Pollut.* **230**. (doi:10.1007/s11270-019-4217-7)

Fent K., Zenker A., Rapp M. 2010 Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environ. Pollut.* **158**, 1817–1824. (doi:10.1016/j.envpol.2009.11.005)

Frangoulis C., Skliris N., Lepoint G., Elkalay K., Goffart A., Pinnegar J.K., Hecq J.H. 2011 Importance of copepod carcasses versus faecal pellets in the upper water column of an oligotrophic area. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **92**, 456–463. (doi:10.1016/j.ecss.2011.02.005)

Gago-Ferrero P., Díaz-Cruz M.S., Barceló D. 2012 An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 2597–2610. (doi:10.1007/s00216-012-6067-7)

Gago-Ferrero P., Díaz-Cruz M.S., Barceló D. 2013 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of organic UV filters and their transformation products in the aquatic environment. *Anal. Methods* **5**, 355–366. (doi:10.1039/c2ay26115d)

Gilbert E., Pirot F., Bertholle V., Roussel L., Falson F., Padois K. 2013 Commonly used UV filter toxicity on biological functions: Review of last decade studies. *Int. J. Cosmet. Sci.* **35**, 208–219. (doi:10.1111/ics.12030)

Giokas D.L., Salvador A., Chisvert A. 2007 UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **26**, 360–374. (doi:10.1016/j.trac.2007.02.012)

González J.G. 1974 Critical thermal maxima and upper lethal temperatures for the calanoid copepods Acartia tonsa and A. clausi. *Mar. Biol.* **27**, 219–223. (doi:10.1007/BF00391947)

González-Rubio S. Vike-Jonas K., Gonzales S., Ballesteros-Gómez A., Sonne C., Dietz R., Boertmann D., Rasmussen L.M., Jaspers V.L.B., Asimakopulos A.G. 2020 Bioaccumulation potential of bisphenols and benzophenone UV filters: A multiresidue approach in raptor tissues. *Sci. Total Environ.* **741**. (doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140330)

Gorbi G *et al.* 2012 Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod Acartia tonsa. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 2023–2028. (doi:10.1002/etc.1909)

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. (doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3)

Guillard R.R., Ryther J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. Cyclotella nana Hustedt, and Denotula confervacea (Cleve) GRAN. *Can. J. Microbiol*. **8**, 229–239. (doi.org/10.1139/M62-029)

Hansen B.W., Drillet G., Kozmér A., Madsen K.V., Pedersen M.F., Sørensen T.F. 2010 Temperature effects on copepod egg hatching: Does acclimatization matter? *J. Plankton Res.* **32**, 305–315. (doi:10.1093/plankt/fbp122)

Hanson K.M., Gratton E., Bardeen C.J. 2006 Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 1205–1212. (doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.011)

He T., Tsui M.M.P., Tan C.J., Ng K.Y., Guo F.W., Wang L.H., Chen T.H., Fan T.Y., Lam P.K.S., Murphy M.B. 2019 Comparative toxicities of four benzophenone ultraviolet filters to two life stages of two coral species. *Sci. Total Environ.* **651**, 2391–2399. (doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.148)

Hong H., Wang J., Shi D. 2021 Effects of salinity on the chronic toxicity of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) in the marine copepod Tigriopus japonicus. *Aquat. Toxicol.* **232**, 105742. (doi:10.1016/j.aquatox.2021.105742)

Hwang D.S., Lee J.S., Lee K.W., Rhee J.S., Han J., Lee J., Park G.S., Lee Y.M., Lee J.S. 2010 Cloning and expression of ecdysone receptor (EcR) from the intertidal copepod, Tigriopus japonicus. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **151**, 303–312. (doi:10.1016/j.cbpc.2009.12.003)

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

Jónasdóttir S.H. 1994 Effects of food quality on the reproductive success of Acartia tonsa and Acartia hudsonica: laboratory observations. *Mar. Biol.* **121**, 67–81. (doi:10.1007/BF00349475)

Juliano C., Magrini G.A. 2017 Cosmetic ingredients as emerging pollutants of environmental and health concern. A mini-review. *Cosmetics* **4**. (doi:10.3390/cosmetics4020011)

Khanna U., Singh K. 2023 Reef safe sunscreens: A call to action. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **37**, e314–e315. (doi:10.1111/jdv.18763)

Kim S., Choi K. 2014 Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. *Environ. Int.* **70**, 143–157. (doi:10.1016/j.envint.2014.05.015)

Kinnberg K.L., Petersen G.I., Albrektsen M., Minghlani M., Awad S.M., Holbech B.F., Green J.W., Bjerregaard P., Holbech H. 2015 Endocrine-disrupting effect of the ultraviolet filter benzophenone-3 in zebrafish, Danio rerio. *Environ. Toxicol. Chem.* **34**, 2833–2840. (doi:10.1002/etc.3129)

Kiørboe T., Møhlenberg F., Hamburger K. 1985 Bioenergetics of planktonic copepod Acartia tonsa: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **26**, 85–97.

Klok C., Hjorth M., Dahllöf I. 2012 Qualitative use of Dynamic Energy Budget theory in ecotoxicology. Case study on oil contamination and Arctic copepods. *J. Sea Res.* **73**, 24–31. (doi:10.1016/j.seares.2012.06.004)

Kopp R., Martínez I.O., Legradi J., Legler J. 2017 Exposure to endocrine disrupting chemicals perturbs lipid metabolism and circadian rhythms. *J. Environ. Sci. (China)* **62**, 133–137. (doi:10.1016/j.jes.2017.10.013)

Kusk K.O., Avdolli M., Wollenberger L. 2011 Effect of 2,4-dihydroxybenzophenone (BP1) 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)

Kwok K.W.H., Souissi S., Dur G., Won E.J., Lee J.S. 2015 Copepods as References Species in Estuarine and Marine Waters. In: Amiard-Triquet C., Amiard J.C., Mouneyrac C. (eds) *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*, pp.281-308, Elsevier Inc. (doi:10.1016/B978-0-12-800949-9.00012-7)

Labille J., Slomberg D., Catalano R., Robert S., Apers-Tremelo M.L., Boudenne J.L., Manasfi T., 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. *Sci. Total Environ.* **706**. (doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136010)

Lambert F.N., Gracy H.R., Gracy A.J., Yoon S.H., Scott R.W., Rincon D.M., Vulpe C.D. 2021 Effects of ultraviolet-filters on Daphnia magna development and endocrine-related gene expression. *Aquat. Toxicol.* **238**, 105915. (doi:10.1016/j.aquatox.2021.105915)

Landry M.R. 1983 The development of marine calanoid copepods with comment on the isochronal rule. *Limnol. Oceanogr.* **28**, 614–624. (doi:10.4319/lo.1983.28.4.0614)

Langford K.H., Reid M.J., Fjeld E., Øxnevad S., Thomas K.V. 2015 Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environ. Int.* **80**, 1–7. (doi:10.1016/j.envint.2015.03.012)

Lassen T.H., Frederiksen H., Jensen T.K., Petersen J.H., Main K.M., Skakkebæk N.E., Jørgensen N., Kranich S.K., Andersson A.M. 2013 Temporal variability in urinary excretion of bisphenol A and seven other phenols in spot, morning, and 24-h urine samples. *Environ. Res.* **126**, 164–170. (doi:10.1016/j.envres.2013.07.001)

Li V.W.T., Tsui M.M.P., Chen X., Hui M.N.Y., Jin L., Lam R.H.W., Murphy M.B., Cheng J., Lam P.K.S., Cheng S.H. 2016 Effects of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) on neuronal and muscular development in zebrafish (Danio rerio) embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 8275–8285. (doi:10.1007/s11356-016-6180-9)

Liu H., Sun P., Liu H., Yang S., Wang L., Wang Z. 2015 Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish Carassius auratus exposed to four benzophenone UV filters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **119**, 116–122. (doi:10.1016/j.ecoenv.2015.05.017)

Loraine G.A., Pettigrove M.E. 2006 Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in Southern California. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 687–695. (doi:10.1021/es051380x)

Lozano C., Givens J., Stien D., Matallana-Surget S., Lebaron P. 2020 Bioaccumulation and toxicological effects of uv-filters on marine species. *Handb. Environ. Chem.* **94**, 85–130. (doi:10.1007/698_2019_442)

Mao F., He Y., Kushmaro A., Gin K.Y.H. 2017 Effects of benzophenone-3 on the green alga Chlamydomonas reinhardtii and the cyanobacterium Microcystis aeruginosa. *Aquat. Toxicol.* **193**, 1–8. (doi:10.1016/j.aquatox.2017.09.029)

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

Mauchline J. 1998 The biology of calanoid copepods. *Advances in Marine Biology, 33*, Academic Press pp.1-710.

Miller I.B., Pawlowski S., Kellermann M.Y., Petersen-Thiery M., Moeller M., Nietzer S., Schupp P.J. 2021 Toxic effects of UV filters from sunscreens on coral reefs revisited: regulatory aspects for "reef safe" products. *Environ. Sci. Eur.* **33**. (doi:10.1186/s12302-021-00515-w)

Miller I.B., Moeller M., Kellermann M.Y., Nietzer S., Di Mauro V., Kamyab E., Pawlowski S., Petersen-Thiery M., Schupp P.J. 2022 Towards the Development of Standardized Bioassays for Corals: Acute Toxicity of the UV Filter Benzophenone-3 to Scleractinian Coral Larvae. *Toxics* **10**. (doi:10.3390/toxics10050244)

Mitchelmore C.L., Burns E.E., Conway A., Heyes A., Davies I.A. 2021 A Critical Review of Organic Ultraviolet Filter Exposure, Hazard, and Risk to Corals. *Environ. Toxicol. Chem.* **40**, 967–988. (doi:10.1002/etc.4948)

Molins-Delgado D., Mánez M., Andreu A., Hiraldo F., Eljarrat E., Barceló D., Díaz-Cruz M.S. 2017 A Potential New Threat to Wild Life: Presence of UV Filters in Bird Eggs from a Preserved Area. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 10983–10990. (doi:10.1021/acs.est.7b03300)

Montes-Grajales D., Fennix-Agudelo M., Miranda-Castro W. 2017 Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Sci. Total Environ.* **595**, 601–614. (doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.286)

Moreira A.L.P., Luchiari A.C. 2022 Effects of oxybenzone on zebrafish behavior and cognition. *Sci. Total Environ.* **808**. (doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152101)

Moreira A.L.P., Paiva W.S., de Souza A.M., Pereira M.C.G., Rocha H.A.O., de Medeiros S.R.B., Luchiari A.C. 2023 Benzophenone-3 causes oxidative stress in the brain and impairs aversive memory in adult zebrafish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **100**. (doi:10.1016/j.etap.2023.104164)

Mustieles V. *et al.* 2023 Benzophenone-3: Comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-analysis of human biomonitoring studies. *Environ. Int.* **173**. (doi:10.1016/j.envint.2023.107739)

Narla S., Lim H.W. 2020 Sunscreen: FDA regulation, and environmental and health impact. *Photochem. Photobiol. Sci.* **19**, 66–70. (doi:10.1039/c9pp00366e)

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine 2022. *Review of Fate, Exposure, and Effects of Sunscreens in Aquatic Environments and Implications for Sunscreen Usage and Human Health*. Washington, DC: The National Academies Press. (doi.org/10.17226/26381)

Niehoff B. 2007 Life history strategies in zooplankton communities: The significance of female gonad morphology and maturation types for the reproductive biology of marine calanoid copepods. *Prog. Oceanogr.* **74**, 1–47. (doi:10.1016/j.pocean.2006.05.005)

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2007. - Validation report of the full life-cycle test with the harpacticoid copepods Nitocra spinipes and Amphiascus tenuiremis and the calanoid Copepod Acartia tonsa. Environmental Directorate, Joint Meeting of the Chemical Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and

Biotechnology. Series on Testing and Assessment, number 79. ENV/JM/MONO(2007)26.

Osterwalder U., Sohn M., Herzog B. 2014 Global state of sunscreens. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **30**, 62–80. (doi:10.1111/phpp.12112)

Ouchene L., Litvinov I.V., Netchiporouk E. 2019 Hawaii and Other Jurisdictions Ban Oxybenzone or Octinoxate Sunscreens Based on the Confirmed Adverse Environmental Effects of Sunscreen Ingredients on Aquatic Environments. *J. Cutan. Med. Surg.* **23**, 648–649. (doi:10.1177/1203475419871592)

Ozáez I., Martínez-Guitarte J.L., Morcillo G. 2014 The UV filter benzophenone 3 (BP-3) activates hormonal genes mimicking the action of ecdysone and alters embryo development in the insect Chironomus riparius (Diptera). *Environ. Pollut.* **192**, 19–26. (doi:10.1016/j.envpol.2014.04.038)

Paffenhöfer G., Stearns D. 1988 Why is Acartia tonsa (Copepoda: Calanoida) restricted to nearshore environments? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **42**, 33–38. (doi:10.3354/meps042033)

Paredes E., Perez S., Rodil R., Quintana J.B., Beiras R. 2014 Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels Isochrysis galbana, Mytilus galloprovincialis, Paracentrotus lividus, and Siriella armata. *Chemosphere* **104**, 44–50. (doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.053)

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. (doi: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. 2022a Long-term effects of neonicotinoids on reproduction and offspring development in the copepod Acartia tonsa. *Mar. Environ. Res.* **181**. (doi:10.1016/j.marenvres.2022.105761)

Picone M., Distefano G.G., Marchetto D., Russo M., Baccichet M., Zangrando R., Gambaro A., Ghirardini A.V. 2022b Inhibition of Larval Development of Marine Copepods Acartia tonsa by Neonocotinoids. Toxics 2022, 10, 158. https://doi.org/10.3390/toxics10040158

Picone M., Russo M., Distefano G.G., Baccichet M., Marchetto D., Volpi Ghirardini A., Lunde Harmansson A., Petrovic M., Gros M., Garcia E., Giubilato E., Calgaro L., Magnusson K., Granberg M., Marcomini A. 2023 Impacts of exhaust gas cleaning systems (EGCS) discharge waters on planktonic biological indicators. *Mar. Pollut. Bull.* **190**, 114846. (doi:10.1016/j.marpolbul.2023.114846)

Portrais K.B., Stevens M.A., Trask C.N., Mundy S.N., Szetela J.M., Bleakley B.H., Dzieweczynski T.L. 2019 Exposure to the ultraviolet filter benzophenone-3 (BP3) interferes with social behaviour in male Siamese fighting fish. *Anim. Behav.* **158**, 175–182.

(doi:10.1016/j.anbehav.2019.10.014)

Ramos S., Homem V., Alves A., Santos L. 2015 Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment - A review. *Sci. Total Environ.* **526**, 278–311. (doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.055)

Ramos S., Homem V., Alves A., Santos L. 2016 A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. *Environ. Int.* **86**, 24–44. (doi:10.1016/j.envint.2015.10.004)

Salvador A., Chisvert A. 2005 Sunscreen analysis: A critical survey on UV filters determination. *Anal. Chim. Acta* **537**, 1–14. (doi:10.1016/j.aca.2005.01.055)

Sánchez-Quiles D., Blasco J., Tovar-Sánchez A. 2020 Sunscreen components are a new environmental concern in coastal waters: An overview. *Handb. Environ. Chem.* **94**, 1–14. (doi:10.1007/698_2019_439)

Sánchez-Quiles D., Tovar-Sánchez A. 2015 Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? *Environ. Int.* **83**, 158–170. (doi:10.1016/j.envint.2015.06.007)

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) 2021, Opinion on Benzophenone-3 (CAS No 131-57-7, EC No 205-031-5), preliminary version of 15 December 2020, final version of 30-31 March 2021, SCCS/1625/20

Scheele A., Sutter K., Karatum O., Danley-Thomson A.A., Redfern L.K. 2023 Environmental impacts of the ultraviolet filter oxybenzone. *Sci. Total Environ.* **863**. (doi:10.1016/j.scitotenv.2022.160966)

Schneider S.L., Lim H.W. 2019 Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **80**, 266–271. (doi:10.1016/j.jaad.2018.06.033)

Sei S., Invidia M., Gorbi G. 2006 Near anoxia and sulfide as possible factors influencing the spatial distribution of Acartia tonsa and Acartia clausi: Comparative evaluation of egg tolerance. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **337**, 121–130. (doi:10.1016/j.jembe.2006.05.015)

Serpone N., Dondi D., Albini A. 2007 Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chim. Acta* **360**, 794–802. (doi:10.1016/j.ica.2005.12.057)

Sieratowicz A., Kaiser D., Behr M., Oetken M., Oehlmann J. 2011 Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for Desmodesmus subspicatus and Daphnia magna. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **46**, 1311–1319. (doi:10.1080/10934529.2011.602936)

Smijs T.G., Pavel S. 2011 Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: Focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **4**, 95–112. (doi:10.2147/nsa.s19419)

Stiefel C., Schwack W. 2015 Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. *Int. J. Cosmet. Sci.* **37**, 2–30. (doi:10.1111/ics.12165)

Støttrup J.G. 2000 The elusive copepods: Their production and suitability in marine aquaculture. *Aquac. Res.* **31**, 703–711. (doi:10.1046/j.1365-2109.2000.00488.x)

Tester P., Turner J.T., 1991. Why is Acartia tonsa restricted to estuarine habitats. in: Proc. Fourth International Conference Copepoda. Bull. Plankton Soc. Japan, Spec. Vol, pp. 603–611

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)

Tovar-Sánchez A., Sánchez-Quiles D., Basterretxea G., Benedé J.L., Chisvert A., Salvador A., Moreno-Garrido I., Blasco J. 2013 Sunscreen Products as Emerging Pollutants to Coastal Waters. *PLoS One* **8**. (doi:10.1371/journal.pone.0065451)

Tsui M.M.P., Leung H.W., Wai T.C., Yamashita N., Taniyasu S., Liu W., Lam P.K.S., Murphy M.B. 2014 Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Res.* **67**, 55–65. (doi:10.1016/j.watres.2014.09.013)

Tsui M.M.P., Lam J.C.W., Ng T.Y., Ang P.O., Murphy M.B., Lam P.K.S. 2017 Occurrence, Distribution, and Fate of Organic UV Filters in Coral Communities. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 4182–4190. (doi:10.1021/acs.est.6b05211)

Turner J.T. 2004 The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. *Zool. Stud.* **43**, 255–266.

Uye S., Fleminger A. 1976 Effects of various environmental factors on egg development of several species of Acartia in Southern California. *Mar. Biol.* **38**, 253–262. (doi:10.1007/BF00388938)

Vecchiato M., Bonato T., Barbante C., Gambaro A., Piazza R. 2021 Organic pollutants in protected plain areas: The occurrence of PAHs, musks, UV-filters, flame retardants and hydrocarbons in woodland soils. *Sci. Total Environ.* **796**, 149003. (doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149003)

Vidal-Liñán L., Villaverde-de-Sáa E., Rodil R., Quintana J.B., Beiras R. 2018 Bioaccumulation of UV filters in Mytilus galloprovincialis mussel. *Chemosphere* **190**, 267–271. (doi:10.1016/j.chemosphere.2017.09.144)

Vione D., Caringella R., De Laurentiis E., Pazzi M., Minero C. 2013 Phototransformation of the sunlight filter benzophenone-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone) under conditions relevant to surface waters. *Sci. Total Environ.* **463**–**464**, 243–251. (doi:10.1016/j.scitotenv.2013.05.090)

Volpe A., Pagano M., Mascolo G., Grenni P., Rossetti S. 2017 Biodegradation of UV-filters in marine sediments. *Sci. Total Environ.* **575**, 448–457. (doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.001)

Vuckovic D., Tinoco A.I., Ling L., Renicke C., Pringle J.R., Mitch W.A. 2022 Conversion of oxybenzone sunscreen to phototoxic glucoside conjugates by sea anemones and corals. *Science (80-.).* **376**, 644–648. (doi:10.1126/science.abn2600)

Westheide W., Rieger R. 2011. *Zoologia sistematica: filogenesi e diversità degli animali*. Zanichelli, Bologna, IT

Wheate N.J. 2022 A review of environmental contamination and potential health impacts on aquatic life from the active chemicals in sunscreen formulations. *Aust. J. Chem.* **75**, 241–248. (doi:10.1071/CH21236)

Wnuk W., Michalska K., Krupa A., Pawlak K. 2022 Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: is it really safe for children and pregnant women? *Postep. Dermatologii i Alergol.* **39**, 26–33. (doi:10.5114/ADA.2022.113617)

Wollenberger L., Breitholtz M., Kusk K.O., Bengtsson B.E. 2003 Inhibition of larval development of the marine copepod Acartia tonsa by four synthetic musk substances. *Sci. Total Environ.* **305**, 53–64. (doi:10.1016/S0048-9697(02)00471-0)

Wollenberger L. 2005 *Toxicity Tests with Crustaceans for Detecting Sublethal Effects of Potential Endocrine Disrupting Chemicals*. Environment & Resources DTU Library, Kongens Lyngby, Denmark

Wootton M., Castellani C. 2017 Crustacea: Copepoda. In: Castellani C., Edwards M. (eds.) *Marine Plankton: A practical guide to ecology, methodology, and taxonomy*, pp.267-380, Oxford University Press. (doi.org/10.1093/oso/9780199233267.003.0022)

Zhang J., Ianora A., Wu C., Pellegrini D., Esposito F., Buttino I. 2015 How to increase productivity of the copepod Acartia tonsa (Dana): Effects of population density and food concentration. *Aquac. Res.* **46**, 2982–2990. (doi:10.1111/are.12456)

Ziarrusta H. *et al.* 2018 Study of bioconcentration of oxybenzone in gilt-head bream and characterization of its by-products. *Chemosphere* **208**, 399–407. (doi:10.1016/j.chemosphere.2018.05.154)

Sitografia

ECHA, 2023a, Oxybenzone – Subsance Information [WWW document]
URL: https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.004.575 consultato in data 31/08/2023

ECHA, 2023b, Oxybenzone – Registration dossier [WWW document]
URL: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/5515/5/2/1 consultato in data 07/09/2023

https://www.recifathome.com/phyto-zoo-plancton-aquaculture-rah/28887-acartia-tonsa-en-oeufs-625-ml-100-000-oeufs.html#googtrans(fr|it) (url consultato in data 27/10/2023)

https://www.diark.org/diark/species_list/Acartia_tonsa (url consultato in data 20/10/2023)

https://www.velp.com/en-ww/rotax-68-overhead-mixer.aspx (url consultato in data 23/11/2023)

ALLEGATI

ALLEGATO A

Elenco dei filtri UV organici con abbreviazioni e N°CAS, approvati dall'Unione Europea con il Regolamento 1223/2009 e s.m.i. (ultima versione al 05/09/2023).

Famiglia	Nomenclatura INCI[a]	Acronimo	N° CAS	Concentrazione limite (%)
Benzophenones	Benzophenone-3	BP-3	131-57-7	2,2 – 6 – 0,5 [1]
	Benzophenone-4	BP-4	4065-45-6	5
	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	DHHB	302776-68-7	10
p-aminobenzoic acid derivatives	Ethylhexyl dimethyl PABA	OD-PABA	21245-02-3	8
	Ethoxylated ethyl 4-aminobenzoate	PEG-25 PABA	116242-27-4	10
Camphors derivatives	4-methylbenzylidene camphor	4-MBC	36861-47-9	4
	Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid	TDSA	92761-26-7	10
	Benzylidene camphor sulfonic acid	BCSA	56039-58-8	6
	Camphor benzalkonium methosulfate	CBM	52793-97-2	6
	Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor	PBC	113783-61-2	6
Salicilates	Ethylhexyl salicilate	EHS	118-60-5	5
	Homosalate	HMS	118-56-9	10 (7,34 [2])
Cinnamates	Ethylhexyl methoxycinnamate	EHMC	5466-77-3	10
	Isoamyl p-methoxycinnamate	IMC	71617-10-2	10
Triazines	Ethylhexyl triazone	EHT	88122-99-0	5
	Diethylhexyl butamido triazone	DBT	154702-15-5	10
	Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine	BEMT	187393-00-6	10
	Tris-biphenyl triazine	–	31274-51-8	10
	Phenylene bis-diphenyltriazine	PBDT	55514-22-2	5
Benzotriazoles	Drometrizole trisiloxane	DTS	155633-54-8	15
	Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	MBBT	103597-45-1	10
Benzimidazole derivatives	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	PBSA	27503-81-7	8
	Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate	DPDT	180898-37-7	10
Dybenzoyl methane derivatives	Butyl methoxydibenzoylmethane	BM-DBM	70356-09-1	5
Crilenes	Octocrylene	OCT	6197-30-4	9 – 10 [3]
Benzylmalonate derivatives	Polysilicone-15	PS15	207574-74-1	10
Others*	Methoxypropylamino cyclohexenylidene ethoxyethylcyanoacetate	MCE	1419401-88-9	3
	Bis- (Diethylaminohydroxybenzoyl Benzoyl) Piperazine	HAA299	919803-06-8	10

[a] *INCI International Nomenclature for Cosmetic Ingredients, è la nomenclatura internazionale utilizzata nelle etichette dei prodotti per gli ingredienti cosmetici*

**Ultimi filtri UV aggiunti nell'Allegato VI del Reg.1223/2009 (MCE nel 2020 e HAA299 nel 2022), non iscrivibili alle precedenti famiglie presentate*

[1] *rispettivamente: per i prodotti per il corpo - per il viso - per proteggere la formulazione del prodotto*

[2] *a decorrere dal 1°gennaio 2025 secondo il Reg.UE 2022/2195 a modifica del Reg.UE 1223/2009*

[3] *rispettivamente: per i prodotti spray ad aerosol - per altri prodotti*

ALLEGATO B

B1 – Medium ISO

Il medium a salinità 20‰ (medium ISO) viene preparato diluendo in rapporto 1:4 la soluzione ipersalina al 10% (Tab. B1a) con il medium M7 di Elendt (Tab. B1c).
In Tab. B1d viene riportata la composizione della *Trace Stock Solution*, utilizzata per la preparazione del medium M7.

Sale	g L^{-1}
NaCl	70.10
Na_2SO_4	11.70
KCl	2.03
KBr	0.293
$Na_2B_4O_7$ $10H_2O$	0.113
$MgCl_2$ $6H_2O$	31.70
$CaCl_2$ $2H_2O$	4.43
$SrCl_2$ $6H_2O$	0.066

Tab. B1a – Composizione della soluzione ipersalina al 10%

Sale	g L^{-1}	ml stock L^{-1}
$NaHCO_3$	2.83	1.0

Tab. B1b – Soluzione di $NaHCO_3$ che viene aggiunta alla soluzione ipersalina

Trace stock solution		50 ml L^{-1}
Macro nutrienti	g L^{-1}	ml L^{-1}
$CaCl_2$ $2H_2O$	29.38	10.00
$MgSO_4$ $7H_2O$	24.66	5.00
KCl	5.80	1.00
$NaHCO_3$	64.80	1.00
$NaSiO_3$ $9H_2O$	10.00	1.00
$NaNO_3$	2.74	0.10
KH_2PO_4	1.43	0.10
K_2HPO_4	1.84	0.10
Soluzione vitamine		
Tiamina cloridrata (B1)	0.75	0.10
Biotina (B8)	0.0075	
Cianocobalamina (B12)	0.01	

Tab. B1c – Composizione finale del medium M7 di Elendt

Composti di elementi in traccia	g L^{-1}	ml L^{-1}
H_3BO_3	14.29	1.00
$MnCl_2$ $4H_2O$	1.80	1.00
LiCl	1.53	1.00
RbCl	0.35	1.00
$SrCl_2$ $6H_2O$	0.76	1.00
NaBr	0.08	1.00
Na_2MoO_4 $2H_2O$	0.32	1.00
$CuCl_2$ $2H_2O$	0.084	1.00
$ZnCl_2$	0.26	1.00
$CoCl_2$ $6H_2O$	0.20	1.00
KI	0.065	1.00
Na_2SeO_3	0.044	1.00
Soluzione Fe-EDTA		
Na_2EDTA $2H_2O$	0.62	20.00
$FeSO_4$ $7H_2O$	0.25	

Tab. B1d – Composizione della Trace Stock Solution

B2 – Medium F/2 di Guillard

Per la preparazione del medium F/2 di Guillard si procede con la preparazione dell'acqua di mare sintetica (ASTM, Tab.B2a) a cui verranno aggiunti i composti di Tab. B2b per la formulazione finale del medium.

Sale	g L^{-1}
$SrCl_2$ $6H_2O$	0.02
H_3BO_3	0.03
KBr	0.10
KCl	0.70
$CaCl_2$ $2H_2O$	1.47
Na_2SO_4	4.00
$MgCl_2$ $6H_2O$	10.78
NaCl	23.50
$NaHCO_3$	0.20

Tab. B2a – Composizione dell'acqua ASTM

Composto	Soluzione stock	F/2 finale	Concentrazione molare finale (M)
	g L^{-1}	ml L^{-1}	
$NaNO_3$	75.00	1	$8.82 * 10^{-4}$
NaH_2PO_4	4.35	1	$3.62 * 10^{-5}$
$NaSiO_3$ $9H_2O$	30.00	1	$1.06 * 10^{-4}$
soluzione metalli in traccia	Tab.B2c	1	–
soluzione vitamine	Tab.B1c	0.5	–

Tab. B2b – Composizione finale del medium F/2 di Guillard

Composto	Soluzione stock	Quantità L^{-1}	Concentrazione molare finale (M)
	g L^{-1}		
$FeCl_3$ $6H_2O$	–	3.15 g	$1.17 * 10^{-5}$
Na_2EDTA $2H_2O$	–	4.36 g	$1.17 * 10^{-5}$
$CuSO_4$ $5H_2O$	9.8	1 mL	$3.93 * 10^{-8}$
Na_2MoO_4 $2H_2O$	6.3	1 mL	$2.60 * 10^{-8}$
$ZnSO_4$ $7H_2O$	22.0	1 mL	$7.65 * 10^{-8}$
$CoCl_2$ $6H_2O$	10.0	1 mL	$4.20 * 10^{-8}$
$MnCl_2$ $4H_2O$	180.0	1 mL	$9.10 * 10^{-7}$

Tab. B2c – Composizione della soluzione metalli in traccia *per il medium F/2*

ALLEGATO C

Valori dei parametri pH e ossigeno disciolto (espresso anche come percentuale di saturazione) misurati nei tre test di tossicità effettuati.

C1 – Test LDR

pH	Test LDR	
	t_0	t_3
Controllo	8.39	7.94
0.1 µg L^{-1}	8.20	8.15
1 µg L^{-1}	8.11	8.16
10 µg L^{-1}	8.28	8.21
100 µg L^{-1}	8.27	8.21
1000 µg L^{-1}	8.30	8.19

Tab. C1a – Valori di pH misurati durante il test LDR

O_2 mg L^{-1} (% sat.)	Test LDR	
	t_0	t_3
Controllo	8.97 (97.9%)	8.84 (99.7%)
0.1 µg L^{-1}	8.74 (97.6%)	8.91 (100.3%)
1 µg L^{-1}	8.84 (97.6%)	8.79 (98.9%)
10 µg L^{-1}	8.74 (97.1%)	8.89 (100.3%)
100 µg L^{-1}	8.64 (95.9%)	8.87 (99.2%)
1000 µg L^{-1}	8.81 (98.5%)	8.89 (99.1%)

Tab. C1b– Valori di ossigeno disciolto misurati durante il test LDR

C2 – Test di produzione uova e pellets

pH	Test di produzione uova e pellets				
	t_0	t_3	t_5	t_7	t_{10}
Controllo		8.10	8.21	8.25	8.34
0.1 µg L^{-1}		8.19	8.25	8.33	8.38
1 µg L^{-1}		8.19	8.25	8.39	8.44
10 µg L^{-1}	8.08	8.20	8.27	8.28	8.43
100 µg L^{-1}	8.29	8.13	8.24	8.12	7.87

Tab. C2a – Valori di pH misurati durante il test di produzione uova e pellets

O_2 mg L^{-1} (% sat.)	Test di produzione uova e pellets				
	t_0	t_3	t_5	t_7	t_{10}
Controllo		8.77 (98.6%)	8.92 (101.7%)	8.79 (100.8%)	8.53 (95.5%)
0.1 µg L^{-1}		8.71 (98.0%)	8.68 (98.4%)	8.53 (98.0%)	8.29 (93.5%)
1 µg L^{-1}		8.75 (98.8%)	8.85 (100.0%)	8.72 (100.2%)	8.49 (96.1%)
10 µg L^{-1}	8.98 (100.0%)	8.73 (98.5%)	8.50 (96.0%)	8.47 (97.2%)	8.32 (93.2%)
100 µg L^{-1}	8.62 (95.7%)	8.56 (96.3%)	8.60 (97.7%)	7.00 (80.3%)	5.91 (66.8%)

Tab. C2b – Valori di Ossigeno Disciolto misurati durante il test di produzione di uova e pellets

C3 – Test cronico

pH	Test cronico									
	t_0	t_3	t_5	t_7	t_9	t_{12}	t_{14}	t_{16}	t_{19}	t_{21}
Controllo	8.39	7.94	7.81	7.83	7.79	7.78	7.73	7.96	8.11	8.14
0.1 µg L^{-1}	8.20	8.15	7.87	7.91	8.00	8.07	8.04	8.11	8.17	8.11
1 µg L^{-1}	8.11	8.16	8.03	8.02	8.04	8.05	8.09	8.05	8.16	8.10
10 µg L^{-1}	8.28	8.21	7.98	7.93	8.00	8.05	8.03	7.92	8.16	8.06

Tab. C3a – Valori di pH misurati durante il test cronico

O_2 mg L^{-1} (% sat.)	Test cronico									
	t_0	t_3	t_5	t_7	t_9	t_{12}	t_{14}	t_{16}	t_{19}	t_{21}
Controllo	8.97 (97.9%)	8.84 (99.7%)	8.15 (94.0%)	8.24 (94.9%)	7.81 (89.8%)	7.87 (89.9%)	8.19 (94.7%)	8.42 (94.6%)	8.27 (92.5%)	8.69 (100.3%)
0.1 µg L^{-1}	8.74 (97.6%)	8.91 (100.3%)	8.26 (95.2%)	8.33 (95.4%)	8.03 (92.3%)	8.00 (90.9%)	8.23 (94.8%)	8.43 (94.7%)	8.31 (93.3%)	8.16 (94.1%)
1 µg L^{-1}	8.84 (97.6%)	8.79 (98.9%)	8.25 (94.9%)	8.32 (95.5%)	7.86 (90.2%)	7.78 (89.0%)	8.14 (94.1%)	8.25 (92.5%)	8.20 (92.1%)	8.39 (97.0%)
10 µg L^{-1}	8.74 (97.1%)	8.89 (100.3%)	8.04 (92.3%)	8.05 (92.5%)	7.49 (86.3%)	7.57 (86.7%)	8.01 (92.5%)	8.30 (92.9%)	8.18 (91.9%)	8.27 (95.4%)

Tab. C3b – Valori di Ossigeno Disciolto misurati durante il test cronico

ALLEGATO D

Set di criteri di accettabilità per i test di tossicità svolti, secondo le indicazioni riportate in Picone et al. (2018, 2022a), e relativi valori ottenuti.

Test	Parametro	Criteri di accettabilità	Valori ottenuti
Test di sviluppo larvale	H nel controllo (F_0)	H > 0.80	0.87 ± 0.02
	ELS_m nel controllo (F_0)	ELS_m < 0.30	0.06 ± 0.04
	LDR nel controllo (F_0)	0.30 < LDR < 0.70	0.63 ± 0.04
Test di produzione uova e pellet	Uova prodotte nel controllo *(uova femmina^{-1} g^{-1})*	> 7.0	7.8 ± 1.2
Test cronico	Uova prodotte nel controllo *(uova femmina^{-1} g^{-1})*	> 7.0	8.4 ± 0.9
	H nel controllo (F_1)	H > 0.80	0.96 ± 0.01
	ELS_m nel controllo (F_1)	ELS_m < 0.30	0.26 ± 0.03
	LDR nel controllo (F_1)	0.30 < LDR < 0.70	0.36 ± 0.03

ALLEGATO E

Test di sviluppo larvale

Dati relativi al numero di uova immesse al giorno 0 e al numero di uova, naupli e copepoditi rinvenuti al termine del test (giorno 5), con i valori dei parametri LDR, ELS_m e H.

Trattamenti	Repliche	t_0	t_5			LDR	ELS-m	H
		Uova	Uova	Naupli	Copepoditi			
controllo	**C1**	36	7	12	17	0.59	0.00	0.81
	C2	38	3	8	19	0.70	0.23	0.92
	C3	27	2	6	17	0.74	0.08	0.93
	C4	38	6	9	22	0.71	0.03	0.84
	C5	41	6	16	19	0.54	0.00	0.85
	C6	37	5	15	16	0.52	0.03	0.86
0.1	**R1**	30	8	6	11	0.65	0.23	0.73
	R2	36	2	9	21	0.70	0.12	0.94
	R3	32	5	8	11	0.58	0.30	0.84
	R4	46	8	14	19	0.58	0.13	0.83
	R5	37	7	15	15	0.50	0.00	0.81
	R6	32	4	4	20	0.83	0.14	0.88
1	**R1**	29	2	5	18	0.78	0.15	0.93
	R2	35	6	7	11	0.61	0.38	0.83
	R3	35	4	15	10	0.40	0.19	0.89
	R4	28	4	8	8	0.50	0.33	0.86
	R5	27	5	10	11	0.52	0.05	0.81
	R6	38	3	11	14	0.56	0.29	0.92
10	**R1**	27	4	10	13	0.57	0.00	0.85
	R2	34	5	8	14	0.64	0.24	0.85
	R3	42	11	12	17	0.59	0.06	0.74
	R4	38	6	10	21	0.68	0.03	0.84
	R5	28	5	8	15	0.65	0.00	0.82
	R6	34	9	8	13	0.62	0.16	0.74
100	**R1**	42	9	18	15	0.45	0.00	0.79
	R2	27	4	7	14	0.67	0.09	0.85
	R3	26	9	8	8	0.50	0.06	0.65
	R4	29	3	10	13	0.57	0.12	0.90
	R5	24	3	8	9	0.53	0.19	0.88
1000	**R1**	29	7	9	12	0.57	0.05	0.76
	R2	40	1	22	17	0.44	0.00	0.98
	R3	54	10	17	22	0.56	0.11	0.81
	R4	32	2	9	13	0.59	0.27	0.94

ALLEGATO F

Test di produzione uova e pellet

Dati relativi alla produzione giornaliera di uova e pellet per i cinque trattamenti nei giorni 11, 12, 13 e 14.

Trattamenti	Produzione giornaliera di uova (uova femmina^{-1} giorno^{-1})			
	g 11	g 12	g 13	g 14
Control	0.8 ± 0.4	3.5 ± 0.9	10.1 ± 2.2	17.0 ± 2.0
0.1 µg L^{-1}	1.0 ± 0.6	2.2 ± 1.4	8.2 ± 2.8	8.6 ± 4.0
1 µg L^{-1}	3.0 ± 1.8	2.0 ± 0.8	6.4 ± 2.5	18.6 ± 3.4
10 µg L^{-1}	3.6 ± 1.5	5.1 ± 1.5	6.7 ± 2.2	12.2 ± 2.7
100 µg L^{-1}	1.7 ± 0.9	3.9 ± 2.2	7.2 ± 3.0	12.3 ± 3.0

Media ± errore standard della produzione giornaliera di uova per i cinque trattamenti allestiti

Trattamenti	Produzione giornaliera di pellet (pellet femmina^{-1} giorno^{-1})			
	g 11	g 12	g 13	g 14
Control	50.5 ± 6.5	60.4 ± 5.5	124.5 ± 12.8	155.8 ± 10.3
0.1 µg L^{-1}	32.6 ± 10.0	51.0 ± 16.6	109.4 ± 18.1	132.0 ± 20.8
1 µg L^{-1}	51.1 ± 6.0	62.3 ± 8.4	108.3 ± 15.6	110.6 ± 14.9
10 µg L^{-1}	44.6 ± 6.7	58.3 ± 9.1	121.8 ± 10.9	128.2 ± 13.3
100 µg L^{-1}	63.6 ± 8.6	68.7 ± 9.9	122.6 ± 18.5	112.3 ± 18.3

Media ± errore standard della produzione giornaliera di pellet per i cinque trattamenti allestiti

ALLEGATO G

G1 – Test cronico

Dati relativi alla produzione giornaliera di uova e pellet per i quattro trattamenti nei giorni 20, 21 e 22.

Trattamenti	Produzione giornaliera di uova (uova femmina^{-1} giorno^{-1})		
	g 20	g 21	g 22
Control	4.7 ± 0.4	12.4 ± 1.6	8.8 ± 1.3
0.1 µg L^{-1}	8.8 ± 1.0	13.3 ± 1.6	9.8 ± 0.9
1 µg L^{-1}	3.3 ± 1.5	5.5 ± 1.9	12.3 ± 2.6
10 µg L^{-1}	4.3 ± 0.8	7.4 ± 1.7	8.3 ± 2.1

Media ± errore standard della produzione giornaliera di uova per i quattro trattamenti allestiti

Trattamenti	Produzione giornaliera di pellet (pellet femmina^{-1} giorno^{-1})		
	g 20	g 21	g 22
Control	67.6 ± 11.4	99.6 ± 11.0	99.6 ± 8.3
0.1 µg L^{-1}	58.5 ± 6.2	102.3 ± 10.1	91.2 ± 9.4
1 µg L^{-1}	49.3 ± 6.0	70.8 ± 20.5	107.8 ± 10.0
10 µg L^{-1}	47.4 ± 3.2	80.0 ± 12.2	86.4 ± 14.1

Media ± errore standard della produzione giornaliera di pellet per i quattro trattamenti allestiti

G2 – Test LDR su F_1

Dati relativi al numero di uova immesse al giorno 0 e al numero di uova, naupli e copepoditi rinvenuti al termine del test (giorno 5), con i valori dei parametri LDR, ELS_m e H.

Trattamenti	Repliche	t_0	t_5			LDR	ELS-m	H
		Uova	Uova	Naupli	Copepoditi			
control	**C1**	47	1	16	14	0.47	0.35	0.98
	C2	27	1	16	5	0.24	0.19	0.96
	C3	31	1	17	9	0.35	0.13	0.97
	C4	32	1	12	7	0.37	0.39	0.97
	C5	31	2	13	8	0.38	0.28	0.94
	C6	36	1	16	8	0.33	0.31	0.97
0.1	**R1**	40	2	28	5	0.15	0.13	0.95
	R2	47	0	38	4	0.10	0.11	1.00
	R3	46	2	33	2	0.06	0.20	0.96
	R4	20	0	18	1	0.05	0.05	1.00
	R5	43	2	37	3	0.08	0.02	0.95
	R6	29	3	21	0	0.00	0.19	0.90
1	**R1**	26	2	5	0	0.00	0.79	0.92
	R2	24	1	17	0	0.00	0.26	0.96
	R3	49	3	22	4	0.15	0.43	0.94
	R4	35	0	26	4	0.13	0.14	1.00
	R5	30	1	17	2	0.11	0.34	0.97
	R6	33	1	15	0	0.00	0.53	0.97
10	**R1**	29	0	23	2	0.08	0.14	1.00
	R2	50	2	43	4	0.09	0.02	0.96
	R3	51	2	38	6	0.14	0.10	0.96
	R4	30	3	15	1	0.06	0.41	0.90
	R5	38	0	14	3	0.18	0.55	1.00
	R6	28	1	23	4	0.15	0.00	0.96