



**ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

---

SCUOLA DI SCIENZE  
Corso di laurea Magistrale in Biologia Marina  
Campus di Ravenna

**Alterazione di risposte fisiologiche nei mitili *Mytilus galloprovincialis* esposti a caffeina, contaminante emergente dell'ambiente marino.**

Relatore:  
Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da:  
Alessia Perra

Correlatore:  
Dr.ssa Sara Buratti

III sessione

Anno Accademico 2012-2013



*Ai miei genitori...*

*ai miei nonni...*



## **INDICE**

<b>1.INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1 FARMACI, INQUINANTI EMERGENTI .....	2
1.2 CLASSI DI FARMACI NELL'AMBIENTE .....	5
1.3 IL DESTINO DEI FARMACI NELL'AMBIENTE.....	8
1.3.1 Il trattamento delle acque .....	10
1.3.2 La “green pharmacy” e altre azioni di mitigazione.....	16
1.4 FARMACI E LEGISLAZIONE .....	17
1.5 VALUTAZIONE ECOTOSSICOLOGICA .....	21
1.6 LA CAFFEINA.....	24
1.6.1 La caffeina, contaminante emergente .....	24
1.6.2 Esposizione alla caffeina .....	26
1.6.3 Meccanismo d'azione della caffeina .....	29
1.6.4 La caffeina nell'ambiente acquatico .....	30
1.6.5 Effetti della caffeina sugli organismi acquatici.....	33
1.7 I BIOMARKER .....	35
<b>2.SCOPO DELLA RICERCA .....</b>	<b>41</b>
<b>3.MATERIALI E METODI .....</b>	<b>45</b>
3.1 IL MITILO MEDITERRANEO, <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	46
3.2 ESPOSIZIONE DEI MITILI AL TRATTAMENTO CON CAFFEINA.....	48
3.3 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY (NRRA).....	50
3.4 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA .....	50
3.5 ACCUMULO DEI LIPIDI NEUTRI.....	51
3.6 ACCUMULO DELLE LIPOFUSCINE .....	51
3.7 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA).....	52
3.8 SAGGI ENZIMATICI.....	53
3.8.1 Preparazione dei campioni per l'analisi dell'attività di Catalasi, GST e Acetilcolinesterasi .....	53
3.8.2 Determinazione dell'attività della Catalasi (CAT) .....	53
3.8.3 Determinazione dell'attività della glutatione s-transferasi (GST) .....	54
3.8.4 Determinazione dell'attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE) .....	54
3.9 DOSAGGIO DELLE PROTEINE.....	55
3.10 ANALISI STATISTICA.....	55
<b>4.RISULTATI.....</b>	<b>57</b>
4.1 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY .....	58
4.2 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA .....	58

4.3 ACCUMULO DEI LIPIDI NEUTRI.....	60
4.4 ACCUMULO DELLE LIPOFUSCINE .....	61
4.5 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA) IN GHIANDOLE DIGESTIVE.....	62
4.6 RISPOSTE ANTIOSSIDANTI E DETOSSIFICANTI.....	63
4.6.1 Determinazione dell'attività della catalasi nelle ghiandole digestive .....	63
4.6.2 Determinazione dell'attività della catalasi nelle branchie.....	64
4.6.3 Determinazione dell'attività della glutatione s-transferasi (GST) nelle ghiandole digestive .....	65
4.6.4 Determinazione dell'attività della glutatione s-transferasi (GST) nelle branchie..	66
4.7 ATTIVITA' DELL'ENZIMA ACETILCOLINESTERASI .....	67
Determinazione dell'attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE) sulle branchie.....	67
<b>5.DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....</b>	<b>69</b>
<b>6.BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>77</b>

# **1.INTRODUZIONE**

## 1.1 FARMACI, INQUINANTI EMERGENTI

La presenza di composti chimici, chiamati contaminanti "emergenti", nelle acque reflue e negli ambienti acquatici (*Pham and Proulx, 1997; Rosal et al., 2010; Vogelsang et al., 2006*) è rilevata da molti anni. Il termine "emergente" quindi non ha un'accezione temporale ma sottolinea una differenza esistente tra gli inquinanti definiti "convenzionali" (ad es. metalli come piombo, mercurio, etc.) o quelli definiti 'contaminanti prioritari' (DDT, PCB, PAH, etc...) per cui invece esistono limiti di legge, da altri, fra cui ad esempio i farmaci umani o veterinari. L'US EPA (United States - Environmental Protection Agency) definisce gli inquinanti emergenti come sostanze chimiche prive di uno status normativo e che hanno un impatto sull'ambiente e sulla salute umana poco noti. Il problema degli inquinanti emergenti infatti è la mancanza di conoscenze sul loro impatto, con effetti a medio e lungo termine sulla salute umana, l'ambiente e gli ambienti acquatici in particolare (*Deblonde et al., 2011*). Tra gli inquinanti emergenti sono considerati tutti i farmaci ed anche altri microinquinanti organici in genere tensioattivi, prodotti per la cura personale quali shampoo, deodoranti e detergenti in genere (*Boxall et al., 2012*), estrogeni, composti perfluorati, esteri dell'acido ftalato nonché nanoparticelle organiche e inorganiche (*Diaz-Cruz et al., 2009; Clarke and Smith, 2011*). Gli ormoni naturali come il  $\beta$ -estradiolo oppure gli steroidi sintetici come l'etinilestradiolo sono regolarmente escreti attraverso le urine, facendosi strada negli ambienti naturali attraverso gli impianti di trattamento delle acque reflue. Analogamente, sostanziali quantità di farmaci dopo l'assunzione sono escreti non modificati e raggiungono le acque di scarico. Come risultato, questi composti sono comunemente rilevati a livelli elevati nelle acque di scarico. I depuratori non sono adeguati per eliminare molte delle sostanze farmaceutiche (ad esempio la carbamazepina viene depurata sotto al 10%), pertanto queste sono diffuse in tutti i comparti acquatici a livello globale. L'universo di questa categoria di prodotti comprende anche forme parentali delle sostanze chimiche (il principio attivo o profarmaci, precursori inattivi che vengono convertiti nella forma attiva da normali processi metabolici), e inoltre i loro metaboliti bioattivi e prodotti di trasformazione (compresi coniugati) (*Daughton, 2007*).

La presenza di farmaci nell'ambiente è un tema che ha acquisito rilevanza in tempi relativamente recenti. Il problema fu evidenziato negli USA e in Canada agli inizi degli anni '70 e quasi un decennio più tardi in Inghilterra. Tuttavia, è stato solo a metà degli anni '90, con l'evolversi nelle tecniche di analisi, che la contaminazione ambientale da

parte di questi composti è stata rilevata in maniera estensiva. Il potere delle tecniche di rilevamento mediante cromatografia o spettrometria di massa consente oggi limiti di rilevazione a concentrazioni che vanno dai ng/L ai µg/L; questo ha permesso ai ricercatori di quantificare un grande numero di medicinali (principi attivi o loro metaboliti) in ambiente, e ciò ha convinto la comunità scientifica a considerare questo tipo di contaminazione come un potenziale problema che merita ulteriori indagini. I farmaci vengono destinati all'uso umano o animale in quantità che raggiungono le centinaia di tonnellate per anno (*Santos et al., 2010*); escreti dall'organismo o volutamente eliminati come rifiuti vengono degradati più lentamente di quanto siano rilasciati in ambiente e perciò risultano pseudo-persistenti. Considerando che essi sono composti differenti rispetto agli inquinanti convenzionali, in quanto sono progettati per interagire con gli organismi biologici a basse dosi, si può capire come l'interesse dell'opinione pubblica, degli organi legislativi competenti e della comunità scientifica sia progressivamente aumentato (*Daughton and Ternes, 1999*). I composti farmacologicamente attivi possono essere introdotti nei sistemi acquatici dagli scarichi industriali (*Daughton e Ternes, 1999*), a seguito di pratiche di allevamento (*Meyer et al., 2000*), attraverso le acque di scarico degli ospedali, ma soprattutto domestiche (*Glassmeyer et al., 2005*).

La diffusa e significativa presenza di residui di prodotti farmaceutici e loro metaboliti nelle acque superficiali in particolare (*Kolpin et al., 2002; Boyd et al., 2003; Buerge et al., 2003; Bendz et al., 2005; Glassmeyer et al., 2005*) attesta la mancanza di un'efficace eliminazione da parte degli impianti di trattamento delle acque reflue (*Ternes, 1998*), oltre ad una relativa persistenza degli stessi nelle acque riceventi. Sono stati condotti molti studi volti a comprendere la trasformazione dei prodotti farmaceutici nelle acque superficiali, maggiormente concentrati sulla foto-degradazione rispetto alla degradazione microbica, come percorso di rimozione. I ricercatori hanno osservato che alcuni composti farmaceutici, compresi ranitidina, sulfametossazolo, diclofenac, ofloxacina, atorvastatina e propanololo possono essere foto-degradati abbastanza rapidamente. Altri, compresi carbamazepina, levofloxacina, cimetidina, e acido clofibrico, sono in gran parte resistenti a questo processo (*Andreozzi et al., 2003; Buser et al., 1998; Lam e Mabury, 2005*). Studi più dettagliati di degradazione microbica dei farmaci si sono concentrati sulla rimozione durante il trattamento delle acque reflue (*Ternes, 1998; Clara et al., 2005; Joss et al., 2005*), ma le informazioni sulla velocità di degradazione microbica dei farmaci o altri composti di origine antropica nelle acque dolci (*Bradley et al., 2007*;

Groning et al., 2007; Lim et al., 2008), e in particolare nelle acque marine o di estuario (Ying e Kookana, 2003) sono ancora veramente poche.

L'interesse scientifico verso la presenza di prodotti farmaceutici nell'ambiente deriva in gran parte dalla preoccupazione per i possibili effetti tossicologici e per le implicazioni derivanti dall'esposizione umana attraverso il consumo di acqua potabile (Schulman et al., 2002; Schwab et al., 2005), l'esposizione degli organismi acquatici (Jones et al., 2001), e lo sviluppo della resistenza microbica agli antibiotici che si verifica in questi ecosistemi (Lear et al., 2002; Thomas et al., 2005). Valutazioni dettagliate sugli eventuali rischi richiederanno una migliore comprensione del destino ambientale, compresi i tassi e le vie di degradazione microbica. Recensioni recenti hanno trattato la presenza degli EOC (contaminanti organici emergenti) nelle acque superficiali utilizzate per l'approvvigionamento idrico pubblico (Houtman, 2010), le fonti, la presenza e il destino di "contaminanti organici emergenti" in sorgenti d'acqua superficiali (Pal et al., 2010), e tracce di inquinanti ed EOC in fonti di acqua dolce (Murray et al., 2010) (Fig. 1.1). In una review di Jones et al. (2005), 11 tipologie di contaminanti organici emergenti sono state segnalate nelle acque potabili in Germania, Regno Unito, Italia, Canada e Stati Uniti. Anche se i singoli composti sono stati generalmente trovati a concentrazioni considerate troppo basse per causare effetti acuti (cioè tipicamente <100 ng/L), è chiaro che gli effetti tossici dovuti ad un'esposizione a lungo termine ad una combinazione di basse concentrazioni di un insieme di contaminanti emergenti non sono ben comprese.

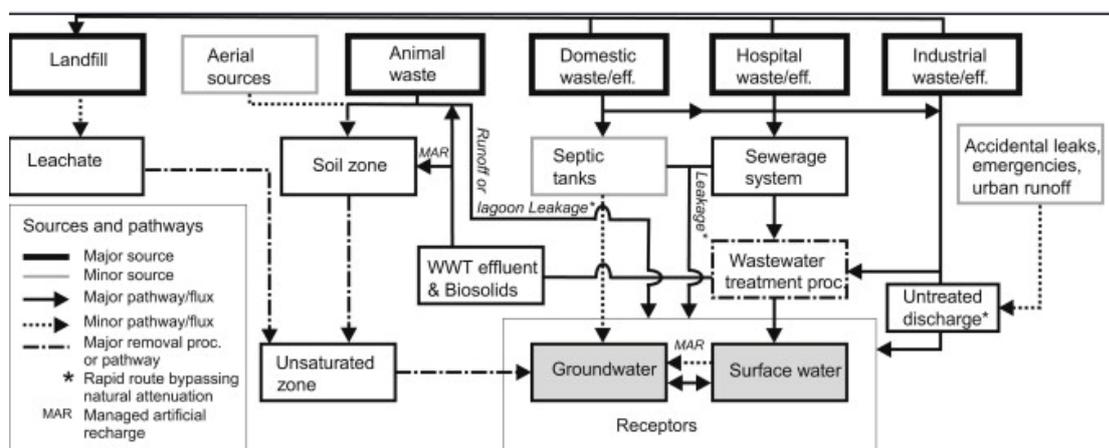
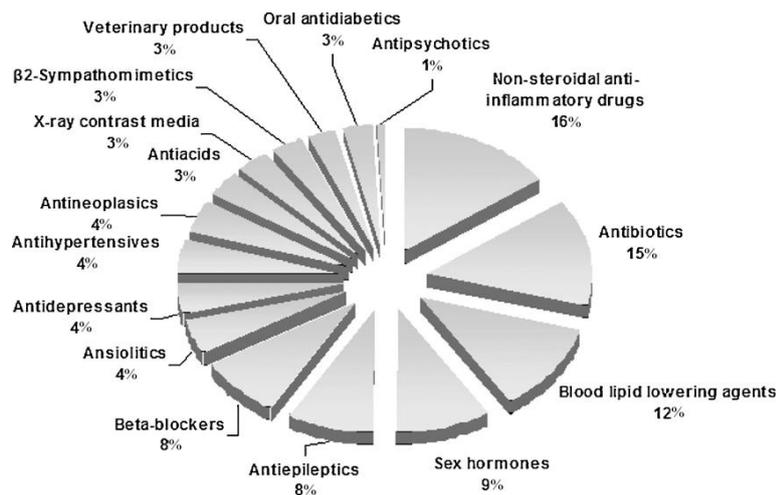


Fig.1.1. Rappresentazione schematica utilizzando l'approccio sorgente-percorso-recettore, in cui vengono evidenziate le potenziali fonti e vie di inquinamento da EOC basati sulla letteratura (Halling-Sørensen et al., 1998; Heberer, 2002; Díaz-Cruz e Barceló, 2008).

## 1.2 CLASSI DI FARMACI NELL'AMBIENTE

I più comuni prodotti farmaceutici ritrovati in ambiente sono farmaci analgesici/antinfiammatori, antibiotici, regolatori di lipidi, beta-bloccanti, steroidi e ormoni correlati (*Halling-Sorensen et al., 1998; Fent et al., 2006; Daughton e Ternes, 1999; Santos et al., 2010*). In particolare gli effluenti contengono alte concentrazioni dei farmaci non soggetti a prescrizione come antidolorifici e farmaci anti-infiammatori non steroidei conosciuti come FANS (paracetamolo, ibuprofene, aspirina). Sono presenti diffusamente anche antibiotici (sulfamidici e macrolidi), farmaci per la cura del colesterolo,  $\beta$ -bloccanti (propranololo) e composti vari come la carbamazepina, la cotinina, caffeina (Fig. 1.2). FANS come l'ibuprofene, naprossene e l'aspirina si trovano di solito in quantità significative in effluenti urbani (nell'intervallo dei  $\mu\text{g/L}$ ). L'ibuprofene è stato segnalato per avere un valore medio di  $3.1 \mu\text{g/L}$  in effluenti urbani e livelli di circa  $0.1-0.8 \mu\text{g/L}$  sono stati trovati in acque riceventi, suggerendo un trasporto significativo in tali sistemi (*Ashton et al., 2004*). In un altro studio, i livelli di FANS hanno raggiunto valori di  $1 \mu\text{g/L}$  per diclofenac,  $1.3 \mu\text{g/L}$  per l'ibuprofene,  $0.2 \mu\text{g/L}$  per ketoprofene, e  $2.6 \mu\text{g/L}$  per naproxen in effluenti negli impianti di trattamento delle acque reflue (*Tixier et al., 2003*). Così, i FANS spesso raggiungono concentrazioni nel range di  $10 \mu\text{g/L}$ . Anche se l'ibuprofene viene rimosso con tassi di efficienza variabili (dal 40% al 90%) tra i diversi impianti di depurazione (*Paxeus, 2004; Carballa et al., 2004*), l'elevato uso di questa classe di farmaci da parte della popolazione umana contribuisce alla loro presenza nelle acque riceventi in quantità significative (*Metcalf et al., 2003*). Un gran numero di farmaci sono utilizzati in medicina veterinaria, tra questi antibiotici e antinfiammatori (*Fent et al., 2006*).

Un certo numero di composti presenti nelle acque reflue compresi i prodotti farmaceutici, steroidi naturali e sintetici, e tensioattivi sono stati collegati a disturbi endocrini (*Sonnenschein e Soto, 1998*). Gli ormoni steroidei sono di particolare interesse a causa della loro potenza perché gli organismi acquatici che possiedono i recettori molecolari specifici potrebbero anche subire gli effetti di tali composti. Effetti secondari, non considerati importanti nel trattamento che riguarda l'uomo, possono anche avere importanti implicazioni per gli organismi acquatici (*Seiler 2002*). Chiari effetti nocivi dell'attività estrogenica sugli organismi acquatici sono stati riportati ampiamente in letteratura (*Santos et al., 2010*).



**Fig.1.2.** Classi terapeutiche di farmaci rilevate nell'ambiente, espressi in percentuale relativa. I dati provengono da 134 articoli pubblicati tra il 1997 e il 2009 (Santos *et al.*, 2010).

La comunità scientifica è in pieno accordo con la possibilità che gli effetti, derivati dalla presenza di prodotti farmaceutici, siano dannosi non solo per la salute umana, ma anche per gli organismi acquatici (Tabella 1.1). Questi effetti, talvolta, tendono a manifestarsi lentamente fino ad arrivare ad una condizione finale irreversibile, spesso evidenziata diverse generazioni dopo (Santos *et al.*, 2010). In realtà ancora poco si sa sugli effetti ecotossicologici dei farmaci sugli organismi acquatici, terrestri e sulla fauna selvatica e una review completa ad oggi manca. Gli organismi acquatici sono obiettivi particolarmente importanti, in quanto sono esposti ai residui nelle acque per tutta la loro vita.

Sono stati riportati i risultati di test di ecotossicità acuta per diversi prodotti farmaceutici; questi hanno in genere mostrato che non vi sono effetti alle concentrazioni ambientali, e quindi per alcuni anni il problema è stato messo da parte (Fent 2003). Nell'ultimo decennio però gli studi hanno preso in considerazione altre tipologie di effetti e metodologie di studio, facendo evidenziare effetti deleteri sulla salute degli organismi acquatici, noti ormai su scala mondiale. Tra questi è possibile citare la diminuzione della fertilità di alcune specie acquatiche esposte ai principi attivi della pillola anticoncezionale (Säfholm *et al.*, 2012) oppure l'elevata mortalità di avvoltoi che si alimentavano di animali trattati con l'antiinfiammatorio diclofenac (Taggart *et al.*, 2007).

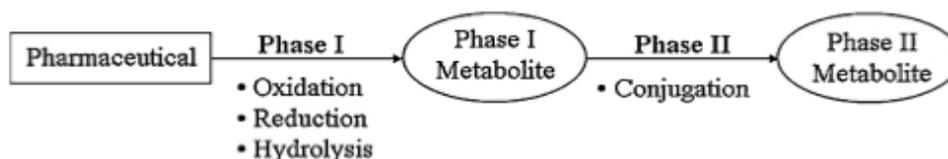
**Tabella 1.1. Sintesi degli effetti che i farmaci, a basse concentrazioni, esercitano in organismi acquatici. Si tratta dei livelli più bassi trovati per effetti a concentrazioni minime (LOEC) (Fent et al., 2010).**

Compound	Effect	LOEC	Organism	Reference
Effects below 10 ng/L				
Estradiol	Feminisation	4 ng/L	<i>Pimephales promelas</i>	Länge et al. (2001)
17- $\alpha$ -Ethinylestradiol EE2 (estrogen)	Complete feminisation	4 ng/L	<i>Rutilus rutilus</i>	Lange et al. (2009)
		10 ng/L	<i>Marisa cornuarietis</i>	Schulte-Oehlmann et al. (2004)
	Fecundity, fertility	10 ng/L	<i>Oryzias latipes</i>	Hutchinson et al. (2003)
	Feminisation	5 ng/L	Tilapia	Shved et al. (2008)
		4 ng/L	<i>Rutilus rutilus</i>	Lange et al. (2008)
	Vitellogenin induction	2 ng/L	<i>Danio rerio</i>	Xu et al. (2008)
		EC <sub>50</sub> : 3.7 ng/L	<i>Salmo trutta</i>	Bjerregaard et al. (2008)
	1 ng/L	<i>Pimephales promelas</i>	Jobling et al. (2003)	
	Increase in egg production	1 ng/L	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Jobling et al. (2003)
Equilenin (estrogen)	Vitellogenin induction	4.2 ng/L	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Tyler et al. (2009)
17-Beta-dihydroequilenin (estrogen)	Vitellogenin induction	0.6 ng/L	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Tyler et al. (2009)
Trenbolone acetate (androgen)	Sex reversal, all male fish	9.7 ng/L	<i>Danio rerio</i>	Holbech et al. (2006)
Levonorgestrel (gestagen, progestin)	Reproductive success	0.8 ng/L	<i>Pimephales promelas</i>	Zeilinger et al. (2009)
Effects at 10–100 ng/L				
17-Methyltestosterone (androgen)	Sex reversal	100 ng/L	<i>Pimephales promelas</i>	Fujioka (2002)
	Sex-reversal, but temperature dependent	10 ng/L	<i>Carassius carassius</i>	Fujioka (2002)
	Imposex	100 ng/L	<i>Marisa cornuarietis</i>	Fujioka (2002)
	Spermatogenesis	100 ng/L	<i>Marisa cornuarietis</i>	Schulte-Oehlmann et al. (2004)
Clotrimazole (fungicide)	Inhibition of algal 14 $\alpha$ -demethylases	17 ng/L	Mixed algal population	Porsbring et al. (2009)
Effects at concentrations >100 ng/L				
Flutamide (antiandrogen)	Effects on spermatogenesis	10 $\mu$ g/L	<i>Poecilia reticulata</i>	Bayley et al. (2002)
	Courtship behaviour, nest building	100 $\mu$ g/L	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Seibre et al. (2008)
Sertraline (selective serotonin reuptake inhibitor)	Reproduction	9 $\mu$ g/L	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Henry et al. (2004)
Fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor)	Alteration of fecundity	56 $\mu$ g/L	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Brooks et al. (2003)
		36 $\mu$ g/L	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Brooks et al. (2003)
	Developmental abnormalities	0.1–5 $\mu$ g/L	<i>Oryzias latipes</i>	Foran et al. (2004)
	Increased female estradiol level	0.1 $\mu$ g/L	<i>Oryzias latipes</i>	Foran et al. (2004)
Longer half life than predicted from mammalian data	0.64 $\mu$ g/L	<i>Oryzias latipes</i>	Paterson and Metcalfe (2008)	
Fadrazole (aromatase inhibitor)	Reduction in fecundity	2 $\mu$ g/L	<i>Pimephales promelas</i>	Ankley et al. (2002)
Carbamazepine (anti-epileptic)	Reproduction	25 $\mu$ g/L	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Ferrari et al. (2003)
Clofibrate acid (anti-hyperlipoproteinemic)	Reproduction	10 $\mu$ g/L	<i>Daphnia magna</i>	Köpf (1995)
Diazepam (anxiolytic)	Regeneration	10 $\mu$ g/L	<i>Hydra vulgaris</i>	Pascoe et al. (2003)
Amlodipine (Ca-channel blocker)	Regeneration	10 $\mu$ g/L	<i>Hydra vulgaris</i>	Pascoe et al. (2003)
Digoxin (digitalis medicine)	Regeneration	10 $\mu$ g/L	<i>Hydra vulgaris</i>	Pascoe et al. (2003)
Propranolol ( $\beta$ -blocker)	Reproduction	0.5 $\mu$ g/L	<i>Oryzias latipes</i>	Huggett et al. (2002)
	Elevated estradiol/testosterone levels in males	1 $\mu$ g/L	<i>Oryzias latipes</i>	Huggett et al. (2002)
Levofloxacin (antibacterial agent)	Growth inhibition	EC (10): 13 $\mu$ g/L	Plant (duckweed)	Brain et al. (2004)
Lomefloxacin (antibacterial agent)	Growth inhibition	EC (10): 8 $\mu$ g/L	Plant (duckweed)	Brain et al. (2004)
Ofloxacin (antibacterial agent)	Growth inhibition	5 $\mu$ g/L	Cyanobacteria	Ferrari et al. (2004)
Sulfamethoxazole (antibacterial agent)	Growth inhibition	5, 9 $\mu$ g/L	Cyanobacteria	Ferrari et al. (2003/2004)
		EC (10): 11 $\mu$ g/L	Plant (duckweed)	Brain et al. (2004)
Triclosan (antibacterial agent)	Altered development	0.15 $\mu$ g/L	<i>Xenopus laevis</i>	Veldhoen et al. (2006)

In ambiente sono stati inizialmente ricercati, e di conseguenza ritrovati, i farmaci assunti a scopo terapeutico, escreti in forma parentale inalterata nelle urine e nelle feci, oppure eliminati come medicinali non utilizzati (scaduti o indesiderati) attraverso il lavandino/toilette o come rifiuti, prima di essere portati in discarica. Tuttavia oggi è nota anche la presenza di:

- a) composti risultanti dal metabolismo post-consumo, dal momento che molti farmaci vengono metabolizzati in quanto l'organismo tenta di convertire composti idrofobici in residui polari più facilmente escreti. La loro bioconversione in uno o più metaboliti può verificarsi durante reazioni di fase I e reazioni di fase II (Fig. 1.3). Le reazioni di fase I sono ossidazione, riduzione e idrolisi che modificano la struttura originaria della molecola

con l'introduzione di gruppi funzionali più ricettivi alle reazioni di fase II. Le reazioni di fase II (o reazioni di coniugazione) consistono nell'aggiunta di gruppi endogeni (come l'acido glucuronico, solfato, glutatione, ecc) a gruppi funzionali presenti nella molecola originale o nel suo metabolita derivato dalla fase I per aumentarne la idrosolubilità.



**Fig.1.3. Rappresentazione schematica di biotrasformazione farmaceutica per aumentare la polarità. Adattato da Daughton e Ternes, 1999.**

- b) composti diagnostici, quali mezzi di contrasto a raggi X, che vengono direttamente scaricati nelle loro forme native.
- c) farmaci veterinari. Poiché le pratiche agricole hanno da sempre previsto lo spargimento del letame sul terreno come fertilizzante, è emersa la possibilità di contaminazione diretta del suolo. E' dimostrata la capacità dei vegetali di assorbire i farmaci ambientali. C'è anche il rischio di diffusione con la pioggia, quindi, potenzialmente, vengono contaminate sia le acque superficiali circostanti sia quelle sotterranee.
- d) farmaci per l'acquacoltura, i cui prodotti farmaceutici impiegati, così come i loro metaboliti e prodotti di degradazione, sono direttamente scaricati nelle acque superficiali.

### **1.3 IL DESTINO DEI FARMACI NELL'AMBIENTE**

Il comportamento e il destino dei farmaci utilizzati nella medicina umana e/o veterinaria e dei loro metaboliti nell'ambiente acquatico non è ancora ben conosciuto. La bassa volatilità che caratterizza molti di questi composti, indica che la loro distribuzione nell'ambiente avviene principalmente attraverso il trasporto idrico, ma anche attraverso la catena alimentare (*Fent et al., 2006*), nonché occasionalmente, attraverso le acque reflue non trattate (Fig. 1.4). Alcuni farmaci raggiungono, come precedentemente detto, le acque superficiali (come quelle di fiumi, laghi ed estuari) e infine le acque sotterranee, dopo aver resistito al processo di degradazione biologica. Tuttavia, nelle acque superficiali

possono essere degradati attraverso diversi processi quali la fotolisi, la cui efficacia dipende da fattori come l'intensità dell'irraggiamento solare, latitudine, stagione e la presenza di fotosensibilizzatori (ad esempio nitrati, acidi umici) (Boreen et al., 2003; Bartels and Tumpling Jr., 2007).

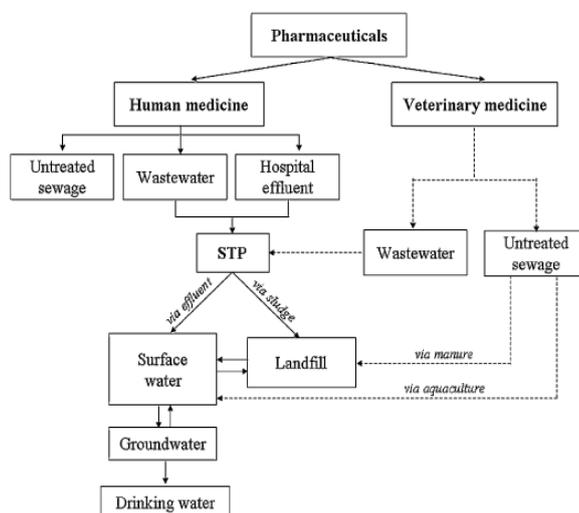


Fig.1.4. Rappresentazione delle fonti più comuni e il destino di prodotti farmaceutici nell'ambiente (K. Kummerer, 2001).

Nel trattamento delle acque reflue, due processi di rimozione sono generalmente importanti: adsorbimento di solidi sospesi e biodegradazione. L'adsorbimento dipende sia dal comportamento idrofobo sia dalle interazioni elettrostatiche dei farmaci con il particolato e i microrganismi (Fent et al., 2006). In generale, l'adsorbimento di residui farmaceutici sembra non essere molto importante per la loro eliminazione dalle acque. Pertanto, i livelli dei prodotti farmaceutici che si ritrovano nei liquami e nei sedimenti risultano essere relativamente bassi, come è stato dimostrato in diversi studi di monitoraggio (Ternes et al., 2004; Urase e Kikuta, 2005). La biodegradazione risulta essere, invece, il più importante processo nel trattamento: essa può avvenire in zone aerobiche e anaerobiche di trattamento dei liquami (intesi anche come fanghi) o anaerobicamente nel processo di digestione degli stessi. In generale, la decomposizione biologica di microinquinanti, inclusi i farmaci, aumenta con l'aumento del tempo di ritenzione idrica e con l'età dei liquami nel trattamento degli stessi. Studi sui tassi di rimozione, durante il processo di trattamento delle acque reflue, si basano principalmente sulle misure delle concentrazioni degli effluenti, e variano secondo la costruzione e tecnologia del trattamento, tempo di ritenzione idrica e la stagione. Ad ogni modo, la forma e l'estensione del rischio di contaminazione finale dipenderà anche dalla posizione geografica della struttura dove avviene il trattamento. Tuttavia, occorre essere

consapevoli del fatto che se un particolare farmaco (o suo residuo) non viene rilevato in un effluente proveniente da un impianto di trattamento, questo non implica che sia stato completamente rimosso. In alcune occasioni, potrebbe essere stato degradato e aver dato origine a metaboliti oscuri che potranno successivamente contaminare le acque superficiali (*Daughton and Ternes, 1999; Heberer, 2002; Zwiener et al., 2001*). In generale è difficile avere un quadro completo di ciò che effettivamente sarà in grado di contaminare le acque superficiali a causa di diversi fenomeni, quali la diluizione dell'acqua, o i processi di trattamento e scarico (*Ternes, 1998*).

Le proprietà dei contaminanti, così come il tempo di permanenza nelle acque sotterranee, le condizioni redox e il carico totale saranno importanti nel determinare la presenza e la persistenza nel sottosuolo e nelle acque sotterranee stesse. Gli EOC introdotti sulla superficie del suolo saranno potenzialmente in grado di migrare attraverso il terreno (*Oppel et al., 2004; Scheytt et al., 2004*), nella zona insatura ed infine in quella satura (*Snyder et al., 2004; Zuehlke et al., 2004*). I principali processi che controllano gli EOC durante la migrazione nel sottosuolo sono principalmente l'assorbimento di materia organica e minerali argillosi, lo scambio ionico nel suolo e nella falda, e la degradazione microbica o trasformazioni varie.

### **1.3.1 Il trattamento delle acque**

I sistemi di trattamento delle acque reflue sono progettati per la raccolta e il trasporto delle stesse e per ridurre la materia organica che può causare riduzione di ossigeno nelle acque superficiali destinate, con l'obiettivo di ridurre nutrienti, quali azoto e fosforo, che possono causare eccessiva fertilizzazione dei laghi riceventi, ruscelli e mare. Quando i farmaci, o ciò che rimane di essi dopo l'uso, entrano negli impianti di trattamento delle acque reflue, il loro destino è regolato dalla fisica, chimica e dalle loro proprietà biologiche, nonché dai processi di trattamento in uso presso l'impianto. Gli impianti di trattamento attuali non sono progettati per la riduzione o degradazione di prodotti farmaceutici. In alcuni casi, essi però possono essere biologicamente degradati, se le condizioni dei processi nell'impianto sono favorevoli. Tre meccanismi principali devono essere presi in considerazione per comprendere il destino delle sostanze nei sistemi di trattamento delle acque reflue: evaporazione di composti volatili, capacità dei composti di aderire alle particelle e la solubilità dei prodotti farmaceutici in acqua (*la Cour Jansen e Ledin, 2009*). Quello che si sa oggi è che pochissimi farmaci sono volatili. Ciò significa che l'evaporazione dagli impianti non è significativa. La maggior parte delle sostanze

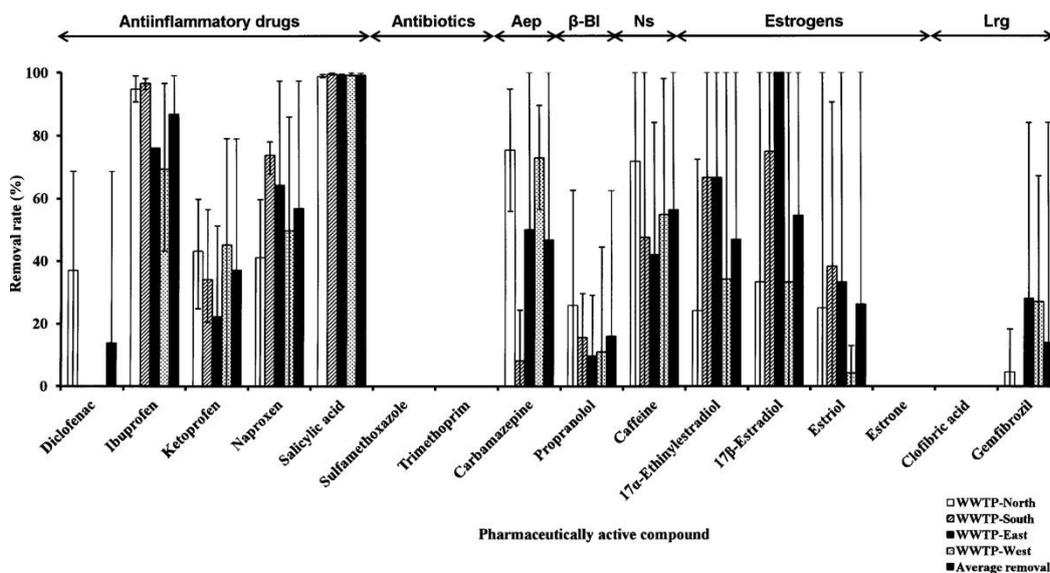
sono solubili in acqua e passano attraverso l'impianto, a meno che non vengano degradate. Il principale metodo attuale per il trattamento dei fanghi è la digestione anaerobica, ma è stato osservato che la distruzione di prodotti farmaceutici derivati da questo processo è efficace solo in pochi casi. Di conseguenza, la maggior parte dei prodotti di questa tipologia deve essere gestita dalla STP (Sewage Treatment Plant). Anche in questo caso, la biodegradazione di queste molecole dipende dalle loro proprietà chimiche nonché dalle capacità degradanti dei batteri. Se i prodotti farmaceutici aderiscono alle particelle, possono essere utilizzati metodi fisici; tuttavia, in questo caso l'unico risultato ottenuto è la separazione dalle acque reflue senza nessuna distruzione dei prodotti farmaceutici. Oltre alla rimozione di questi ultimi tutte le altre particelle e sostanze adsorbite alle stesse vengono rimosse. Ciò significa in generale una migliorata rimozione di molte altre sostanze dalle acque reflue, come materia organica particolata, azoto e fosforo, metalli pesanti e anche patogeni, ma si deve tenere in considerazione che queste particelle avranno bisogno di ulteriori trattamenti. Un altro modo per poter trasformare tali molecole è l'approccio chimico. Questi metodi possono provocare una completa o parziale distruzione dei prodotti farmaceutici. La distruzione parziale può portare alla formazione di nuove sostanze, che normalmente sono meno dannose di quelle della sostanza chimica d'origine. Esistono tuttavia esempi in cui i prodotti di degradazione ottenuti sono più dannosi rispetto al composto da cui hanno avuto origine. Ad esempio, esperimenti di degradazione con carbamazepina hanno mostrato la formazione di diversi prodotti di trasformazione compresi acridina e acrodone; quest'ultimo composto è un esempio di molecola che ha effetti biologici indesiderati di maggiore importanza rispetto al composto originale, poiché è noto per causare danni al DNA e presenta una maggiore ecotossicità ( *la Cour Jansen e Ledin, 2009*).

La valutazione dell'efficienza di rimozione negli impianti di depurazione (confrontando i contenuti nell'affluente e nell'effluente, si veda Tabella 1.2) è stata studiata nel dettaglio, mostrando tassi di rimozione che possono differire fino al 99% (*Ternes, 1998; Stumpf et al., 1999; Carballa et al., 2004; Roberts and Thomas, 2006; Lindqvist et al., 2005; Santos et al., 2010*).

**Tabella 1.2. Concentrazioni degli inquinanti emergenti ( $\mu\text{g/L}$ ) negli influenti ed effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue (Deblonde et al., 2011).**

Pharmaceuticals compounds	Molecules	Influent						Effluent						Removal rate (%)
		Means	RSD	Median	Min	Max	n	Means	RSD	Median	Min	Max	n	
Antibiotics	Clarithromycin	0.344					2	0.15					2	56.4
	Ciprofloxacin	0.62	1.48	0.157	0.09	5.524	13	0.234	0.649	0.021	0.007	2.378	13	62.3
	Doxycycline	0.65	0.94	0.098	0.067	2.48	10	0.420	0.426	0.227	0.038	1.09	9	35.4
	Erythromycin	0.58	0.242	0.56	0.346	0.83	3	0.297	0.237	0.2305	0.109	0.62	4	48.8
	Erythromycin-H <sub>2</sub> O	2.025					2	0.59					2	70.9
	Methronidazole	0.09					1	0.055					1	38.9
	Norfloxacin	0.115	0.056	0.0905	0.066	0.25	12	0.0526	0.0985	0.0195	0.007	0.33	10	54.3
	Oloxacin	0.482	0.884	0.156	0.007	2.275	6	0.171	0.317	0.0485	0.007	0.816	6	64.5
	Roxithromycin	0.78	0.737	0.81	0.0272	1.5	3	0.472	0.435	0.54	0.008	0.87	3	39.5
	Sulfamethoxazole	0.32	0.248	0.2905	0.02	0.674	10	0.264	0.150	0.243	0.07	0.62	11	17.5
Antiepileptics	Sulfapyridin	0.492					1	0.081					1	83.5
	Tetracyclin	48					1	2.375					2	95.1
	Trimethoprim	0.43	0.401	0.251	0.0535	1.3	15	0.424	0.363	0.32	0.04	1.34	17	1.4
	Carbamazepine	0.732	0.869	0.25	0.0819	1.68	6	0.774	0.789	0.37	0.042	2.1	13	-5.7
	4-aminoantipyrine	1.517					1	0.676					1	55.4
	Antipyrin	0.04					1	0.027					1	32.5
	Cocain	2.8605					2	1.93					2	32.5
	Diclofenac	1.039	1.283	0.232	0.16	3.1	6	0.679	0.701	0.55	0.04	2.448	11	34.6
	Ibuprofen	13.482	25.639	3.495	0.0143	22.7	10	3.480	1.489	0.56	0.03	12.6	17	74.2
	Indomethacine	0.136					2	0.166	0.118	0.19	0.037	0.27	3	-22.1
Analgesics and anti-inflammatory	Ketoprofen	0.483	0.286	0.441	0.146	0.94	5	0.333	0.148	0.34	0.125	0.63	9	31.1
	Ketorolac	0.407					1	0.228					1	44.0
	Naproxen	5.077	8.251	2.363	0.206	23.21	7	0.934	0.873	0.452	0.017	2.62	13	81.6
	Clofibrac acid	0.215	0.251	0.12	0.026	0.5	3	0.131	0.136	0.12	0.012	0.36	5	39.1
	Fenofibrac acid	0.079					1	0.196	0.161	0.13	0.078	0.38	3	-148.1
	Bezafibrate	1.948	2.320	1.4205	0.05	4.9	4	0.763	0.963	0.13	0.035	2.2	5	60.8
	Gemfibrozil	1.562	1.704	0.71	0.453	3.525	3	0.757	1.068	0.323	0.0112	2.86	6	51.5
	Acetabotolol	0.335					1	0.140					1	58.2
	Atenolol	1.080	0.946	0.996	0.03	1.197	4	0.468	0.381	0.345	0.16	1.025	4	56.7
	Celliprotolol	0.44					1	0.28					1	36.4
Betablockers	Metoprolol	1.535	2.290	0.61	0.02	4.9	4	0.679	0.657	0.73	0.019	1.7	5	55.8
	Propanolol	0.198	0.269	0.005	0.036	0.51	3	0.102	0.0712	0.093	0.03	0.18	5	48.5
	Sotalol	1.667					2	0.79					2	52.6
	Furosemide	0.413					1	0.166					1	59.8
	Hydrochlorothiazide	2.514					1	1.176					1	53.2
	Amidotrizoic acid	2.5					1	2.494					1	0.2
	Diatrizoate	3.3					1	3.3					1	0.0
	Iotalamic acid	1.8					1	1.820					1	-1.1
	Iopromide	9.205					2	2.014	1.40	2.63	0.411	3	3	78.1
	Contrast media	Iomeprol	6.05					2	1.606					2
Iohesol		6.7					2	2.706					2	59.6
Iopamidol		2.3					1	1.9					1	17.4
Galaxolide		4.281	5.01	2.031	0.79	10.022	3	1.019	0.243	1.08	0.751	1.225	3	76.2
Tonalide		0.878					2	0.21					2	76.1

Alcuni studi hanno mostrato che la rimozione del composto originario varia dal 7% (ad esempio per il farmaco antiepilettico carbamazepina) al 96% (per il propranololo,  $\beta$ -bloccante) e che la maggior parte dell'efficienza di rimozione è in media circa il 60% (Daughton e Ternes, 1999). I risultati di alcuni ulteriori studi che si sono occupati di questo argomento sono mostrati nelle figure sotto riportate (Fig. 1.5 e Fig. 1.6):



**Fig.1.5. Efficienze medie di rimozione (%) dei composti farmaceutici indagati. Le linee in ogni barra mostrano i valori di rimozione minimi e massimi (AEP: droghe antiepilettiche;  $\beta$ -BI:  $\beta$ -bloccanti; Ns: stimolanti nervosi; Lrg: regolatori di lipidi) (Camacho-Munoz et al., 2012).**

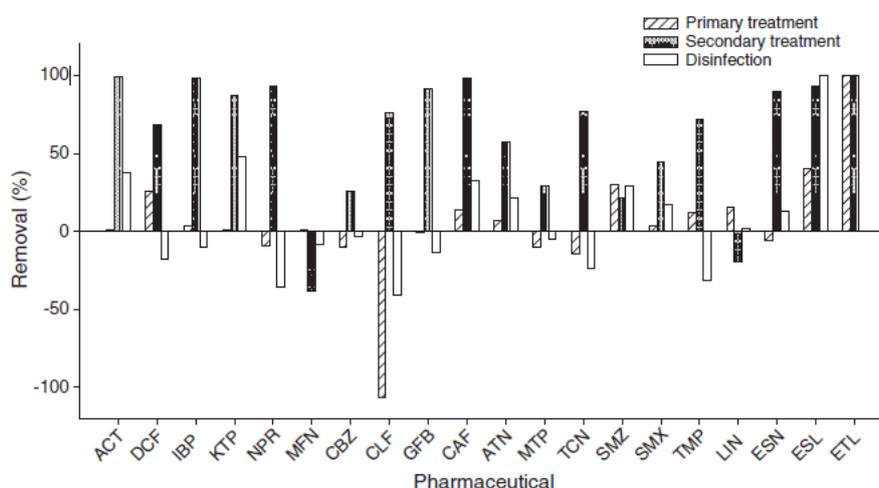


Fig.1.6. Rimozione media dei farmaci bersaglio nei vari processi di trattamento delle acque reflue (Kumar Behera et al.,2011).

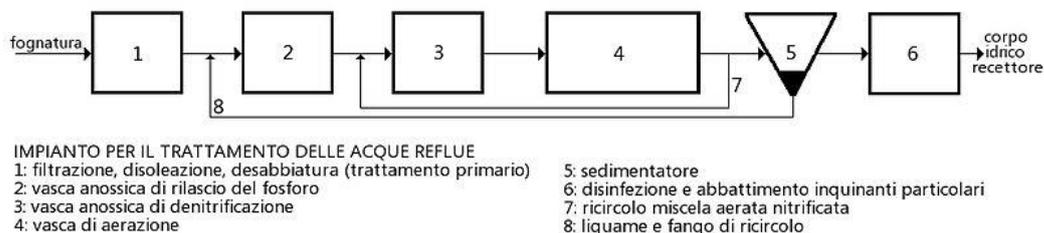
Una vasta gamma di pratiche di trattamento delle acque reflue è impiegata in tutto il mondo per rimuovere queste tipologie di composti, nonostante alcuni vengano rilevati alle concentrazioni nell'ordine dei  $\mu\text{g/L}$ . Alcuni studi hanno trovato che solo il 38-83% degli steroidi naturali e ormoni artificiali vengono rimossi dai comuni processi di trattamento delle acque reflue (Desbrow et al., 1998; Fisher e Borland 2003). Metodi per la rimozione in acque reflue e acqua potabile ad uso agricolo, come l'ozonizzazione e adsorbimento su carbone attivo (GAC) hanno avuto successo su piccola scala (Ternes et al. 2002, 2003), ma allo stato attuale sono in gran parte antieconomici e poco adeguati per la piena scala di trattamento.

Il trattamento delle acque reflue (o depurazione delle acque reflue), come detto in precedenza, è un processo di rimozione dei contaminanti da un'acqua reflua di origine urbana o industriale, ovvero di un effluente che è stato contaminato da inquinanti organici e/o inorganici. Le acque reflue non possono essere reimmesse nell'ambiente tal quali poiché i destinatari finali come il terreno, il mare, i fiumi ed i laghi non sono in grado di ricevere una quantità di sostanze inquinanti superiore alla propria capacità autodepurativa.

Il trattamento di depurazione dei liquami urbani consiste in una successione di più fasi (o processi) durante i quali dall'acqua reflua vengono rimosse le sostanze indesiderate, che vengono concentrate sotto forma di fanghi, dando luogo ad un effluente finale di qualità tale da risultare compatibile con la capacità autodepurativa del corpo ricettore (terreno, lago, fiume o mare) prescelto per lo sversamento, senza che questo ne possa subire danni. Il ciclo depurativo è costituito da una combinazione di più processi di natura chimica,

fisica e biologica. I fanghi provenienti dal ciclo di depurazione sono spesso contaminati con sostanze tossiche e pertanto devono subire anch'essi una serie di trattamenti necessari a renderli idonei allo smaltimento ad esempio in discariche speciali o al riutilizzo in agricoltura tal quale o previo compostaggio.

Solitamente in un impianto di trattamento delle acque reflue si distinguono due linee specifiche, quali la linea acque e la linea fanghi. Nella linea acque vengono trattati i liquami grezzi provenienti dalle fognature, mentre nella linea fanghi vengono trattati i fanghi (separati dal refluo chiarificato) durante le fasi di sedimentazione previste nella linea acque. Lo scopo di tale linea è quello di eliminare l'elevata quantità di acqua contenuta nei fanghi e di ridurre il volume, nonché di stabilizzare (rendere imputrescibile) il materiale organico e di distruggere gli organismi patogeni presenti, in modo tale da rendere lo smaltimento finale meno costoso e meno dannoso per l'ambiente. L'effluente finale trattato o refluo chiarificato viene convogliato in una condotta detta emissario, con recapito finale le acque superficiali (corsi d'acqua, mare, ecc.), incisioni o lo strato superficiale del terreno (es. trincee drenanti). L'effluente finale, se presenta determinate caratteristiche, può anche essere usato per l'irrigazione o nell'industria.



**Fig.1.7. Rappresentazione di un impianto per il trattamento delle acque reflue (fonte: wikipedia.org).**

Quattro trattamenti indispensabili quali grigliatura/stacciatura, dissabbiatura, disoleatura, equalizzazione e omogenizzazione, sono previsti a monte dei processi di depurazione veri e propri e permettono la rimozione di materiali e sostanze che per loro natura e dimensione rischiano di danneggiare le attrezzature poste a valle e di compromettere l'efficienza dei successivi stadi di trattamento. Per quanto riguarda l'ultimo trattamento, la sedimentazione primaria, non tutti gli impianti prevedono il sedimentatore primario, anche se è preferibile la sua presenza. Il trattamento sicuramente più importante dell'intero ciclo di depurazione è quello ossidativo biologico che consiste nella biodegradazione, da parte di microrganismi, di tutte le sostanze organiche presenti nelle acque da depurare, fino a trasformarle in composti molto semplici ed innocui dal punto di

vista ambientale. Questo trattamento non è altro che un'estensione dell'autodepurazione che ha luogo spontaneamente nei corsi d'acqua, operata, nel caso dell'impianto di trattamento, in un ambiente in cui si mantengono artificialmente determinate condizioni ottimali allo scopo di concentrare e accelerare il processo in atto.

Sebbene la maggior parte di questi trattamenti non costituiscano "il cuore" dell'impianto di trattamento (come l'ossidazione biologica effettuata nella vasca ossidativa o vasca di aerazione) sono importantissimi e permettono una depurazione ancora più efficace e spinta in quanto, a monte della vasca di ossidazione, migliorano le caratteristiche del fango biologico con il conseguente aumento della resa dell'ossidazione biologica, e a valle del processo ossidativo migliorano sia l'acqua chiarificata (che verrà scaricata nel corpo recettore dopo aver subito tutti i dovuti trattamenti) sia il fango biologico (che viene ricircolato in parte nella vasca di prima sedimentazione, in parte nella vasca di ossidazione, e in parte smaltito dopo opportuni trattamenti). Fanno parte di questa fase trattamenti chimico-fisici (chiariflocculazione), trattamenti meccanici (filtrazione su carboni attivi o su filtri a sabbia), trattamenti biologico-naturali (fitodepurazione, lagunaggio), trattamenti biologici (nitrificazione, denitrificazione e defosfatazione) e trattamenti di disinfezione (*Contardi et al, 1991; Calza, 2008; Bonomo, 2008; Cirelli, 2003*).

Nello specifico risulta doveroso sottolineare che per la degradazione di inquinanti organici riluttanti come i prodotti farmaceutici in acqua, si possono applicare dei processi di tipo biologico come bioreattori a membrana (MBR), o metodi fisico-chimici quali i processi di ossidazione avanzata (AOP), adsorbimento su carbone attivo come già detto (GAC), trattamento con membrana applicando la nanofiltrazione (NF) o osmosi inversa (RO). Questa tipologia di sostanze, tramite la mineralizzazione, possono essere eliminate completamente oppure convertite in prodotti meno nocivi per l'ambiente acquatico e per la salute umana. I bioreattori a membrana (MBR), costituiti dalla combinazione di un processo biologico a fanghi attivi, una separazione solido-liquido mediante filtrazione su membrana, rappresentano senza dubbio una tipologia di degradazione che avrà un'ampia applicazione nel futuro (*Tambosi et al., 2010*).

Secondo alcuni autori, inoltre, risultano fondamentali, per l'eliminazione di farmaci, il tempo di ritenzione dei fanghi (SRT) (*Zabczyński et al., 2010*) e il tempo di ritenzione idrica (HRT) (*Miege et al., 2009*). Valori di HRT e SRT alti permettono lo svolgimento di reazioni quali la biodegradazione e la realizzazione di meccanismi di assorbimento (*Miege et al., 2009*).

Pertanto, i prodotti farmaceutici oltrepassano le barriere degli impianti di depurazione e raggiungono i corsi d'acqua dove sono rilevati a concentrazioni nell'intervallo dai ng/L ai  $\mu\text{g/L}$  (Fig. 1.8).

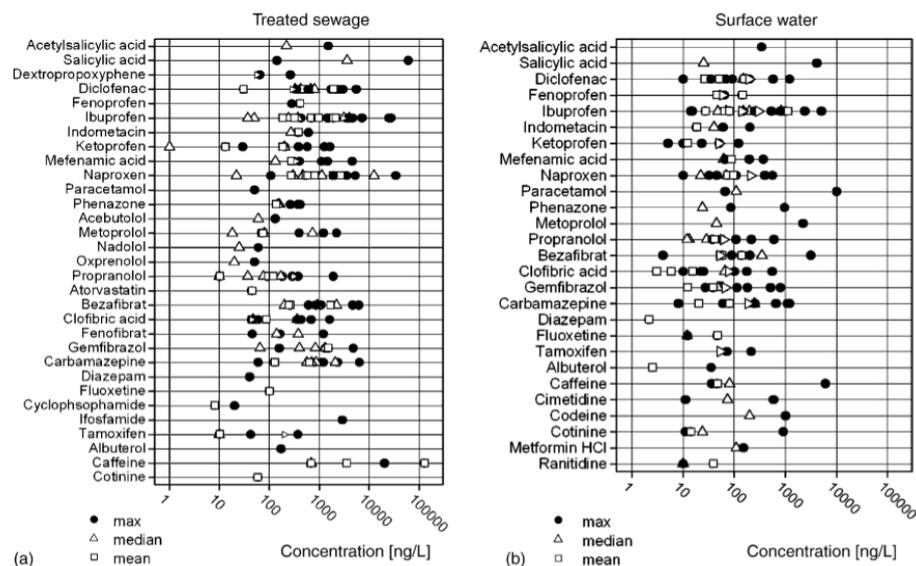


Fig.1.8. Concentrazione di farmaci nelle acque reflue trattate (a) e nell'acqua superficiale (b) (Fent et al., 2006).

### 1.3.2 La "green pharmacy" e altre azioni di mitigazione

L'ultimo decennio è stato caratterizzato da enormi progressi nel promuovere la pratica della "green pharmacy" (ad esempio, riducendo al minimo l'uso di reagenti ecologicamente pericolosi e progettare vie di sintesi alternative)(U.S. EPA Office of Pollution Prevention and Toxics 2002). Infatti, l'industria farmaceutica ha un passato importante nell'applicare la chimica responsabile ecocompatibile (che risulta anche essere economicamente vantaggiosa) per la sintesi e la fabbricazione dei farmaci. Gli stessi principi potrebbero essere estesi ed applicati alla progettazione di farmaci, consegna, design della confezione, distribuzione e smaltimento, in modo tale da beneficiare anche l'utilizzatore finale, e non solo il produttore.

L'acquisizione di una consapevolezza sui rischi associati all'immissione nell'ambiente di molteplici sostanze chimiche, compresi i farmaci, si è avuta con la Marine Strategy Framework Directive (MSFD, 2008), o meglio successivi approfondimenti da parte di esperti (OSPAR, 2012) che includono anche i farmaci tra i contaminanti che possono determinare degli impatti ambientali o eventuali pressioni.

Le opzioni disponibili per minimizzare o prevenire il rilascio di prodotti farmaceutici e per la cura personale nell'ambiente risiedono in una moltitudine di componenti tra cui i settori manifatturieri, i servizi del sistema di assistenza sanitaria, la progettazione dei

farmaci e la loro somministrazione, prescrizione, individuazione delle terapie da applicare, imballaggio, pubblicità, marketing, formazione per gli operatori sanitari, e creazione di banche dati “real-time”, queste tra tante altre. Indipendentemente dalle conseguenze determinate dall’attuale generazione di questi prodotti, ora si ha la conoscenza e la possibilità di considerare più a fondo le potenzialità che essi possiedono e gli effetti sulla salute umana e a livello ecologico, tutto ciò per iniziare a ridurre al minimo la loro introduzione nell’ambiente (*Daughton C.G., 2003a*). Un mosaico di opinioni contrastanti, orientamenti, o regolamenti, esiste tra e all’interno dei paesi per guidare lo smaltimento degli stessi e, infine, determinare la loro disposizione ambientale. Nonostante questo mosaico, una vasta gamma di azioni potrebbe essere presa, sia a breve termine che a lungo termine, per diminuirne l’introduzione nell’ambiente. Dato lo stato attuale delle informazioni relative alla loro presenza nell’ambiente, lo smaltimento di farmaci tramite il loro passaggio nelle reti fognarie è probabilmente il metodo di rimozione meno desiderabile. Negli Stati Uniti alternative migliori, ad esempio, potrebbero includere una rielaborazione dei regolamenti esistenti che impediscono alle farmacie locali di riprendere i farmaci di consumo o raccoglitori dei rifiuti locali pericolosi o indesiderati (*Daughton C.G., 2003b*).

## **1.4 FARMACI E LEGISLAZIONE**

Per più di 20 anni, la legislazione europea ha richiesto una valutazione del rischio ambientale nell’ambito delle procedure di autorizzazione farmaceutiche. Solo in questi ultimi anni, le agenzie di regolamentazione hanno emesso linee guida dettagliate su come i prodotti farmaceutici dovrebbero essere valutati per i possibili effetti indesiderati sull’ambiente (*Fent et al., 2006*). La Direttiva dell’Unione Europea 92/18/EEC ha introdotto per la prima volta, il concetto di requisito per la valutazione del rischio ambientale, per ottenere l’autorizzazione all’immissione in commercio di farmaci veterinari. A tal fine, l’Agenzia Europea per la valutazione dei farmaci (EMEA) ha pubblicato delle linee guida (1998) per valutare il rischio ambientale da parte dei farmaci veterinari, prima che essi venissero messi in commercio. Anche la US Food and Drug Administration (FDA) ha pubblicato una guida per la valutazione di farmaci, però ad uso umano; in base a ciò negli USA sono tenuti a fornire una valutazione ambientale quando l’immissione della concentrazione prevista del principio attivo farmaceutico nell’ambiente acquatico è  $\geq 1 \mu\text{g/L}$  (FDA-CDER,1998). Le valutazioni ambientali da

prodotti farmaceutici veterinari sono richieste dalla US FDA dal 1980 (Boxall et al., 2003). La Commissione Europea ha esteso le sue preoccupazioni verso i farmaci ad uso umano, con la pubblicazione della direttiva 2001/83/EC, che è stata successivamente modificata dalla direttiva 2004/27/EC. Queste direttive stabiliscono che l'autorizzazione all'immissione in commercio di nuovi medicinali ad uso umano deve essere accompagnata da una valutazione del rischio ambientale (ERA), le cui linee guida sono state stabilite, come già detto, dall'EMA. Nel 2006 per la prima volta viene quindi esteso ai farmaci ad uso umano il concetto di 'valutazione del rischio ambientale'. Quest'ultima, sia per quanto riguarda i farmaci veterinari sia quelli ad uso umano, è valutata attraverso un approccio graduale, diviso in due fasi (Fig. 1.9).

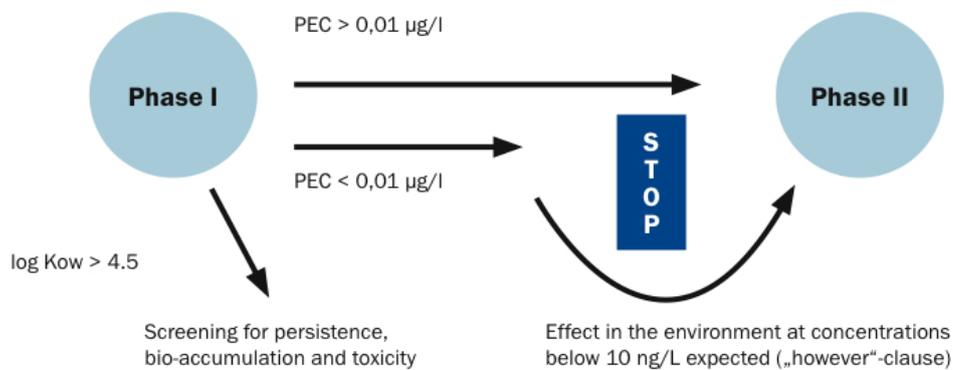
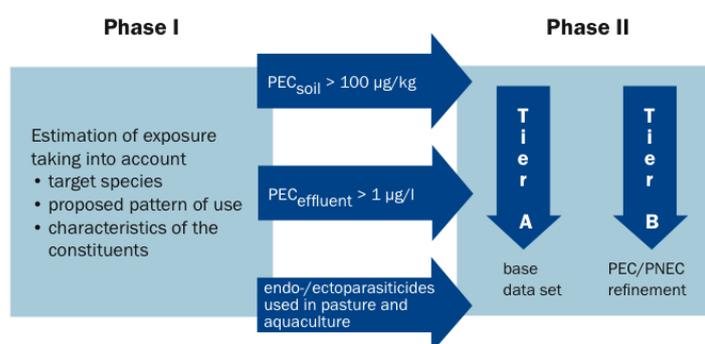


Fig.1.9. Valutazione del rischio ambientale di farmaci ad uso umano (Rechenberg 2009).

Nella fase I le concentrazioni ambientali dei farmaci o loro metaboliti vengono stimate, mentre nella fase II si ha una valutazione di tipo fisico, chimico e delle proprietà ecotossicologiche. La fase II è suddivisa in due parti: livello A, in cui il possibile destino e gli effetti dei farmaci e/o dei loro principali metaboliti vengono valutati e livello B, che si concentra sugli effetti sulla fauna e flora nel raggio dei comparti ambientali che possono essere colpiti (Tabella 1.3 e Fig. 1.10). Tuttavia, i farmaci ad uso umano richiedono solo gli studi riguardanti la fase II se la concentrazione ambientale prevista nelle acque di superficie è pari o superiore a  $0,01 \mu\text{g/L}$  (Rechenberg, 2009; Santos et al., 2010).

**Tabella 1.3. Fasi dell'environmental risk assessment per i farmaci ad uso umano (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CHMP. 2006)**

Stage in regulatory evaluation	Stage in risk assessment	Objective	Method	TEST / DATA REQUIREMENT
Phase I	Pre-screening	Estimation of exposure	Action limit	Consumption data, logKow.
Phase II Tier A	Screening	Initial prediction of risk	Risk Assessment	Base set aquatic toxicology and fate
Phase II Tier B	Extended	Substance and compartment-specific refinement and risk assessment	Risk Assessment	Extended data set on emission, fate and effects



**Fig. 1.10. Valutazione dell'environmental risk assessment dei farmaci veterinari (Rechenberg 2009).**

Quando si suppone che ci sia un elevato rischio di effetti tossici (ad esempio nel caso del potenziale di interferenti endocrini), una valutazione di fase II deve tuttavia essere effettuata a prescindere dalla concentrazione ambientale prevista. Inoltre, uno screening per la persistenza, bioaccumulo e tossicità è necessaria se il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ( $\log K_{ow}$ ) è superiore a 4.5. Questo identifica un potenziale rischio di bioaccumulo. Sostanze naturali come vitamine, elettroliti, amminoacidi, peptidi, proteine, carboidrati, lipidi e medicinali vegetali sono esenti da questo tipo di valutazioni.

Questa valutazione organizzata in più step, si conclude nel momento in cui viene dimostrata la non-pericolosità ambientale del farmaco, e quindi ne viene concessa l'autorizzazione alla vendita, la quale viene rilasciata con etichettature particolari o avvisi di potenziale dannosità per l'ambiente da includere nella documentazione allegata al farmaco, se effettivamente non risulta possibile escludere totalmente un eventuale rischio ambientale. Verranno poi attuate delle misure di mitigazione durante lo stoccaggio, somministrazione ai pazienti e smaltimento nel caso in cui non venga riconosciuta una pericolosità ambientale di un dato farmaco. Anche se la legislazione richiede indagini più

approfondite a concentrazioni ambientali più elevate di 0.01 µg/L, è stato dimostrato che vi sono anche composti che mostrano effetti negativi al di sotto di tale valore.

Pertanto, è importante identificare i composti che potrebbero prevedibilmente agire a basse concentrazioni secondo le loro modalità di azione. Tali prodotti farmaceutici altamente attivi, con prevedibili concentrazioni efficaci a 10 ng/L o a livelli inferiori, sono definiti nei lavori di Christen composti di elevata preoccupazione (high concern). La valutazione del rischio proposto è un approccio graduale che presenta alla base tre principi: 1) l'identificazione di importanti recettori umani e della loro modalità d'azione; 2) l'omologia tra i recettori umani e possibili recettori nei vertebrati inferiori e invertebrati (che sono spesso altamente conservati nella scala evolutiva); 3) l'importanza della specie target (o non target) interessata.

È possibile affermare che, l'attuale legislazione degli Stati Uniti e dell'UE obbliga che i nuovi farmaci siano sottoposti ad una valutazione di impatto ambientale e, di conseguenza, nuovi metodi di valutazione per gli effetti acuti e cronici sono in corso di attuazione. Tuttavia, una significativa mancanza di conoscenza persiste soprattutto per quanto riguarda dati tossicologici dall'interazione sinergica di prodotti farmaceutici (*Santos et al., 2010*). Vi è la necessità di concentrarsi particolarmente sulla valutazione dell'esposizione a lungo termine circa le modalità d'azione specifiche di prodotti farmaceutici per poter giudicare al meglio le implicazioni che i loro residui hanno nei sistemi acquatici. Solo dopo aver colmato queste lacune, le valutazioni dei rischi ambientali saranno più affidabili, con un'incertezza molto più bassa (*Fent et al., 2006*). Una delle lacune fondamentali nella legislazione riguarda il fatto che non esistono linee guida sulle tecniche di misura dei farmaci presenti in acqua e non esistono limiti di legge sulle concentrazioni oltre le quali un'acqua possa essere dichiarata contaminata da farmaci, a differenza di quanto avviene per molti altri contaminanti (ad es. metalli, nitrati, PCB, ecc.). Sicuramente ciò è dovuto a dei limiti che si hanno nel misurare concentrazioni bassissime di determinati contaminanti con le tecnologie a disposizione, e nel non avere prove sufficienti che affermino una reale tossicità sull'uomo da parte dei farmaci dispersi in ambiente.

## 1.5 VALUTAZIONE ECOTOSSICOLOGICA

La valutazione ecotossicologica di prodotti farmaceutici è stata condotta sulla base di esperimenti di tossicità acuta secondo linee guida già esistenti (ad esempio OECD) utilizzando organismi in laboratorio appartenenti a diversi livelli trofici come alghe, zooplancton, altri invertebrati e pesci. Dati relativi alla tossicità acuta di prodotti farmaceutici sono stati pubblicati da Halling-Sorensen *et al.* (1998) e Webb (2001), dove viene riportata una lista di circa 100 prodotti farmaceutici umani provenienti da diverse fonti. Confrontando diversi livelli trofici, Webb (2001) suggerisce che le alghe risultano più sensibili ai farmaci elencati rispetto a *Daphnia magna*, e i pesci ancora meno. Nel tentativo di confrontare le diverse classi di farmaci in termini di tossicità acuta, Webb (2001) ha osservato che la maggior parte dei prodotti tossici erano antidepressivi, antibatterici e antipsicotici, ma il range di risposte entro ciascuna di queste categorie era ampio, tipicamente vari ordini di grandezza. Gli studi sull'esposizione a residui farmaceutici, presenti nell'ambiente acquatico, includono una vasta gamma di organismi. Sicuramente, tra i più trattati, si potrebbero citare quelli sui  $\beta$ -bloccanti, in particolare il propranololo, ampiamente rilevato negli ambienti acquatici. La presenza di tale farmaco è stata recentemente riportata a bioconcentrazioni che raggiungono livelli fino a circa 360  $\mu\text{g/g}$  nei tessuti di mitili (Ericson *et al.*, 2010), e nell'ordine dei mg/L nel sangue dei pesci (Giltrow *et al.*, 2009).

L'esposizione acuta di *D. magna* ad una miscela di 36  $\mu\text{g/L}$  di fluoxetina e 100  $\mu\text{g/L}$  di acido clofibrico ha causato una significativa mortalità e malformazione, mentre non sono stati evidenziati effetti per le stesse concentrazioni dei singoli prodotti farmaceutici (Flaherty and Dodson, 2005). La miscela di trimetoprim con sulfametossazolo e sulfadiazina aumentano significativamente l'inibizione della crescita dell'alga *S. capricornutum* (Eguchi *et al.*, 2004). D'altra parte, l'esposizione dell'anfipode *H. azteca* ad un miscela di sette farmaci non ha evidenziato effetti significativi sulla loro sopravvivenza, accoppiamento, dimensioni del corpo o riproduzione, ma c'era un leggero aumento del numero di maschi (Borgmann *et al.*, 2007). Risultati identici sono stati osservati per i pesci. L'esposizione ad una miscela di sei farmaci, nell'ordine di ng/L, non ha influenzato la loro sopravvivenza, la crescita o la produzione di uova, ma ha portato ad un aumento nel numero di malformazioni nella prole (Parrott and Bennie, 2009). Questi citati sono diversi esempi che evidenziano come la presenza simultanea di molti farmaci

nell'ambiente possa provocare una maggiore tossicità per gli organismi non bersaglio rispetto a quelli previsti per i singoli principi attivi.

Gli studi citati sono solo alcuni esempi, dei tanti lavori, sulla valutazione degli effetti dei farmaci e loro metaboliti, che hanno visto gli organismi acquatici come protagonisti. Tuttavia, per la maggior parte evidenziano effetti sulla vitalità o sulla riproduzione degli organismi utilizzati come test a concentrazioni 10-100 volte maggiori di quelle in ambiente. Questo ha portato a diagnosticare che il rischio ambientale da farmaci non è significativo.

Negli anni più recenti, tuttavia è preso seriamente in considerazione che i farmaci sono progettati per avere target specifici nelle vie metaboliche e molecolari, nell'uomo e negli animali e che una volta introdotti nell'ambiente essi possono agire sulle stesse vie in animali aventi identici o simili organi bersaglio, tessuti, cellule o biomolecole. Alcuni recettori presenti negli animali inferiori sono simili a quelli umani, altri invece, sono diversi o assenti, il che significa che si possono verificare differenti modalità d'azione negli animali inferiori. Il farmaco, in base alla sua funzione, può fungere da antagonista o da agonista di un particolare recettore, regolandone l'attività che si basa sul compito di trasferire ai processi interni l'attivazione o l'inibizione di alcune funzionalità cellulari (*Fent 2006*).

Recentemente, presso il nostro laboratorio è stato condotto uno studio sui mitili *Mytilus galloprovincialis*, i quali sono stati sottoposti per 7 gg a concentrazioni pari a 0.3-3 ng/L di propranololo (*Franzellitti et al., 2011*). Questo tipo di farmaco è stato segnalato per ridurre le possibilità di crescita, la forza del bisso, abbondanza (*Ericson et al., 2010*), e alimentazione (*Solé et al., 2010*) dei mitili. Nei nostri laboratori è stata valutata, tra le tante analisi svolte, la stabilità della membrana lisosomiale (LMS) negli emociti dei mitili esposti a DL-PROP, come biomarker sensibile dello stato di salute degli animali che possono predire le conseguenze a livello di popolazione (*Moore et al., 2006; Viarengo et al., 2007*). È stata osservata effettivamente una significativa riduzione concentrazione-dipendente nella LMS, sostenendo lo sviluppo di una risposta allo stress (*Franzellitti et al., 2011*). Oltre a questo effetto, che possiamo definire generico, nei mitili sono stati osservati anche effetti specifici mediati dai recettori adrenergici di tipo beta e/o dai recettori per la serotonina ai quali il propranololo è particolarmente affine.

Un altro studio del laboratorio ha valutato l'effetto del farmaco antiepilettico carbamazepina (*Martin-Diaz et al., 2009*), osservando significativi effetti sullo stato di salute dei mitili riconducibili allo stress ossidativo prodotto dalla carbamazepina anche

nell'uomo, a cui si aggiungono anche effetti specifici esercitati sui livelli intracellulari di cAMP e sulla attività della PKA. Questi bersagli cellulari e molecolari presenti nel mitilo, sono gli stessi interessati al meccanismo terapeutico con cui agisce la carbamazepina.

Ci sono anche alcuni esempi di studi di tossicità in letteratura i quali dimostrano che la miscela di prodotti farmaceutici a concentrazioni ambientali possono presentare effetto additivo. In alcuni casi, livelli inferiori a quelle previste possono portare effetti tossici quando si ritrovano a far parte di una miscela di sostanze attive (*DeLorenzo e Fleming, 2008*). Ad esempio, Cleuvers in una pubblicazione del 2003 ha mostrato che una miscela di diclofenac e ibuprofene aveva una tossicità più elevata del previsto in *Daphnia magna*. Inoltre quando l'autore ha aggiunto altri due FANS (naproxen e acido acetilsalicilico) una considerevole tossicità anche su *D. magna* è stata riportata, anche a concentrazioni in cui i singoli FANS non presentano effetti (*Cleuvers, 2004*).

L'esposizione del cnidario *H. attenuata* ad una miscela di undici prodotti farmaceutici, appartenenti a diverse classi terapeutiche, ha mostrato effetti sub-letali per le concentrazioni di rilevanza ambientale ( $\mu\text{g-ng L}^{-1}$ ) (*Quinn et al., 2009*).

Alcuni dei progetti di ricerca portati avanti dal laboratorio di fisiologia e biochimica ambientale del Centro Interdisciplinare di Ricerca per le Scienze Ambientali (CIRSA) si sono occupati di analizzare la conservazione di bersagli molecolari e i biomarker. Questi ultimi rappresentano un ottimo strumento per valutare le risposte biologiche ai cambiamenti ambientali e all'esposizione ad inquinanti, sia in condizioni di laboratorio che sul campo. La scelta di utilizzare i mitili in numerosi studi risiede nel fatto che essi sono presenti nell'ambiente, risultano esposti a miscele di farmaci per tutta la loro vita e interagiscono con acqua e sedimenti. Questi organismi sessili e longevi filtrano grandi quantità d'acqua superficiale per l'alimentazione e la respirazione. Sono quindi particolarmente suscettibili a fattori di stress ambientali, diffusa contaminazione, variazioni del livello dell'acqua e variazioni climatiche (ad esempio, fluttuazioni di temperatura nelle acque poco profonde) (*Gagné et al., 2006*). In questo lavoro di tesi vengono valutati gli effetti della caffeina, contaminante emergente nell'ambiente acquatico utilizzata anche nella formulazione di alcuni composti farmaceutici, sui mitili *Mytilus galloprovincialis*.

## 1.6 LA CAFFEINA

### 1.6.1 La caffeina, contaminante emergente

La caffeina, 1,3,7-trimetilxantina (Fig. 1.11), componente maggiormente studiato del caffè, è una sostanza appartenente alla famiglia degli alcaloidi, un gruppo di composti assai diffusi nelle piante, comunemente utilizzati per le loro azioni stimolanti e broncodilatatori.

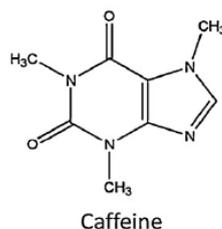


Fig.1.11. Struttura molecolare della caffeina (Cano-Marquina et al., 2013).

Viene a volte citata con i suoi sinonimi guaranina e teina, chimicamente identificabili nella stessa molecola. Estratta soprattutto dal caffè, *Coffea arabica*, famiglia *Rubiaceae*, appartiene al gruppo degli alcaloidi purinici come la teofillina (dal té, *Camellia sinensis*, fam. *Theaceae*), e la teobromina (dal cacao, *Theobroma*, famiglia *Sterculiaceae*), è presente in foglie, semi e frutti di queste e diverse piante, dove agisce come insetticida naturale, paralizzante o con effetto comunque tossico per insetti e altri artropodi che le mangiano. La caffeina non è contenuta soltanto nel caffè ma si trova anche in altre piante ed alimenti. E' il caso, ad esempio, della coca cola, dell'erba mate, del cioccolato, delle bevande energizzanti a base di cola, dei prodotti erboristici come il guaranà, per non parlare poi degli analgesici, dei cosmetici anticellulite o dei farmaci per malattie da raffreddamento. E' curioso notare, ad esempio, come le foglie di tè abbiano un contenuto in caffeina circa doppio (2-4%) rispetto ai semi di caffè (1-2%); tuttavia, a causa del diverso metodo estrattivo, l'infuso contiene all'incirca quattro volte meno caffeina del percolato (Cano-Marquina et al., 2013). Il consumo globale di caffè, secondo la FAO, ha raggiunto circa 7 milioni di tonnellate l'anno (<http://www.fao.org/docrep/006/y5143e/y5143e0v.htm>).

Sostanza stupefacente, dall'effetto stimolante, la caffeina è una comune sostanza psicoattiva tra le più diffuse e consumate al mondo, venendo utilizzata a scopo ricreativo e in ambito medico (Fent et al., 2006; Palo e Choudhury, 2006). È legale in tutti i paesi, a differenza di altre sostanze psicoattive, e le sue concentrazioni nell'ambiente sono state

rilevate nell'intervallo compreso tra 0.07-300 µg/L. Sono tanti i farmaci contenenti questa particolare sostanza tra cui possiamo citare il Viamal, Caffaina Anidra Farma, Cafergot, Virdex, Difmetre, Influmed, Antireumina, Neocibalgina, Neonevral, Neonisidina, Raffreddoremed, Saridon, Optalidon, Neoptalidon e Tachicaf dove la troviamo associata al paracetamolo. È stata anche usata come farmaco nel trattamento dell'apnea in neonati prematuri, inoltre da tempo è riconosciuta come una sostanza che crea dipendenza. L'avvelenamento letale da ingestione di caffeina è molto raro, sebbene la dose letale negli adulti sia di circa 5-10 g [concentrazione nel sangue superiore a 100 µg/mL (*Winek et al., 2001; TIAFT homepage 2002*)]; si possono osservare reazioni avverse in seguito all'ingestione di 1 g (15 mg/kg; concentrazione plasmatica superiore ai 30 µg/mL), quali irrequietezza, eccitazione, tremori, tinnito, mal di testa, insonnia, vomiti, dolori addominali, sintomi tra cui agitazione, rigidità e convulsioni; mentre basse dosi (fino a 2 µg/mL nel sangue) stimolano il sistema nervoso centrale.

Tuttavia, nel corso degli anni, ci sono stati una serie di relazioni per quanto riguarda i decessi dovuti principalmente all'assunzione di "farmaci-sosia" contenenti caffeina (*Garriott et al., 1985; Kanstrup, Petersen 2003*). Così come gli altri alcaloidi (atropina, nicotina, stricnina, morfina ecc.) è fisiologicamente attiva sugli animali anche a concentrazioni molto basse e probabilmente viene impiegata dalla pianta come meccanismo di difesa contro gli erbivori. Anche nell'uomo la caffeina influenza numerosissime reazioni biologiche. Alcune di queste interazioni sono favorevoli per l'organismo mentre altre sono responsabili degli effetti collaterali di questa sostanza.

Il metabolismo della caffeina è qualitativamente simile negli animali e nell'uomo (*Arnaud, 1987,1993*). È metabolizzata mediante demetilazione e ossidazione in posizione 8; la principale via enzimatica nell'uomo procede attraverso la formazione della paraxantina (1,7-dimetilxantina), che porta alla produzione dei principali metaboliti urinari, 1-metilxantina, 1-acido metilurico e il derivato uracil acetilato. Vie minori procedono attraverso la formazione e il metabolismo della teofillina e teobromina. Ha una emivita di circa 4-6 ore, e il suo metabolismo, decisamente superiore rispetto ad altri stimolanti come le amfetamine, avviene principalmente nel fegato, dove l'isoforma del citocromo P450 (CYP1A2) rappresenta quasi il 95% del metabolismo primario. Le metilxantine, tra le quali la caffeina, sono prontamente assorbite dopo somministrazione orale, rettale o parenterale. L'assorbimento della caffeina dal tratto gastrointestinale è rapido. Picchi nei livelli plasmatici sono raggiunti dopo 15-120 minuti, in seguito

all'ingestione, ma già dopo 3-6 ore dall'assunzione i livelli plasmatici si riducono del 50%.

### **1.6.2 Esposizione alla caffeina**

Nel 1999 la produzione mondiale di caffeina è stata stimata per un valore di 10.000-15.000 tonnellate, tra cui 3.000-4.000 tonnellate di caffeina naturale (Europa 5.000-10.000 t/a , Germania 1.000-5.000 t/a). La caffeina viene utilizzata prevalentemente nel settore alimentare e in quello farmaceutico (80% e 16% rispettivamente). Una piccola parte è utilizzata nei cosmetici (3%) o in applicazioni tecniche (1%). Le azioni fisiologiche della concentrazione di caffeina riscontrate nei bevitori di caffè comprendono vari effetti primari e secondari descritti in esperimenti farmacologici selettivi. L'ingestione di 85-250 mg di caffeina (quantità contenuta in 1-3 tazze di caffè) produce un aumento della capacità di sopportare lo sforzo intellettuale e diminuisce il tempo di reazione; tuttavia, compiti che richiedono una fine coordinazione muscolare e un preciso tempismo o abilità aritmetica possono essere condizionati negativamente. Due o tre tazze di caffè possono portare a livelli plasmatici di caffeina che si aggirano intorno ai 20-40  $\mu\text{mol/L}$ , una concentrazione in cui l'azione principale della caffeina è quella di antagonista dei recettori adenosinici.

Si associa agli analgesici nel combattere emicranie, cefalee, mal di testa, dove potenzia l'effetto antidolorifico: è stato suggerito, infatti, che l'aggiunta di caffeina nell'aspirina o la combinazione di aspirina e paracetamolo possano aiutare ad alleviare, appunto, il mal di testa, fornendo una maggiore rapidità di azione e/o il dolore risulta ridotto con una dose inferiore dell'analgesico. Recenti studi con ergotamina indicano che il miglioramento dell'effetto con l'aggiunta di caffeina possa essere dovuto a un migliore assorbimento gastrointestinale di ergotamina quando somministrato con caffeina. Attenua, inoltre, alcuni effetti depressivi provocati da sostanze come l'aspirina, il piramidone, l'antipirina ecc..

L'affinità dei recettori per l'adenosina anche per la caffeina deriva dalla loro somiglianza strutturale; i principali effetti riscontrati nell'uomo influiscono sul sistema cardiovascolare, il sistema nervoso centrale ed endocrino, insieme a modifiche al metabolismo dei carboidrati o nei meccanismi infiammatori. Altre azioni includono l'attivazione del tasso metabolico, aumento della sintesi acida a livello gastrico e aumento della diuresi (*Ohta, Sitkovsky 2011; Beaudoin, Graham 2011*). Anche se gli effetti di questa sostanza sono numerosissimi, la maggior parte di essi è dovuta agli effetti

stimolanti che la caffeina esercita sull'intero organismo. I meccanismi proposti degli effetti fisiologici e farmacologici indotti dalle xantine, tra cui la caffeina appunto, includono: 1) inibizione della fosfodiesterasi, l'enzima che degrada il 3',5'-adenosina monofosfato ciclico (cAMP), con aumento dell'AMP ciclico intracellulare, che media la maggior parte delle azioni farmacologiche della caffeina; 2) effetti diretti sulla concentrazione del calcio intracellulare; 3) sensibilizza i recettori della dopamina; 4) effetti indiretti sulla concentrazione del calcio intracellulare mediante l'iperpolarizzazione della membrana cellulare; 5) disaccoppiamento dell'aumento del calcio intracellulare con gli elementi contrattili muscolari ed infine, come precedentemente citato, 6) antagonismo dei recettori dell'adenosina.

A livello di sistema nervoso determina eccitabilità, miglioramento dei riflessi e della capacità di concentrazione, azione analgesica. Grazie alla sua azione di antagonista competitivo nei confronti dei recettori adenosinici, favorisce il rilascio di due ormoni quali adrenalina e noradrenalina. Questi, definiti catecolamine, favoriscono l'aumento del metabolismo corporeo, della frequenza cardiaca, della pressione arteriosa e del numero di atti respiratori (aumentando così l'ossigenazione del sangue) (*Riksen et al., 2011*). La somministrazione di 250-350 mg di caffeina in individui che non hanno mai assunto metilxantine può provocare, invece, una lieve diminuzione della frequenza cardiaca e un modesto incremento della pressione arteriosa sisto-diastolica (tali dosi non hanno generalmente alcun effetto nei consumatori abituali di caffeina). L'associazione di un leggero aumento, dell'ordine di 10-20 mm Hg, della pressione arteriosa dopo circa 1 h dall'ingestione della caffeina era già stata confermata qualche decennio fa, in un piccolo studio su soggetti non bevitori regolari di caffè (*Robertson et al., 1978*). C'era un concomitante aumento della renina e catecolamine e una diminuzione, che potrebbe essere seguita da un ulteriore incremento, della frequenza cardiaca. L'aumento della pressione sanguigna è stata confermata in un altro studio in cui la caffeina è stata somministrata a soggetti privati di caffè la settimana prima dello studio (*Pincomb et al., 1985*). L'effetto pressorio evidenziato non sembra essere dovuto ad un aumento della gittata cardiaca o contrattilità miocardica, ma ad un aumento della resistenza vascolare sistemica, più probabilmente influenzata dai cambiamenti associati alla renina e ammine, insieme all'effetto diretto della caffeina. Secondo uno studio più recente, questo meccanismo potrebbe essere diverso nelle donne, che subiscono un aumento del volume della gittata e della forza di contrazione del cuore, ma nessun cambiamento nella resistenza periferica (*Hartley et al., 2004*). L'aumento della pressione arteriosa in

associazione con l'assunzione di caffeina (200-300 mg) in pazienti già ipertesi è stata indagata in diversi studi, che sono unanimi nel rilevare lievi aumenti della pressione sistolica e diastolica fino a 3h dopo l'ingestione della caffeina, secondo una recente revisione sistematica e meta-analisi (*Mesas et al., 2011*).

Questa sostanza, come altre metilxantine, si pensa agisca in primo luogo attraverso la stimolazione del centro respiratorio midollare. Questa azione è stata osservata in alcuni stati fisiopatologici, come ad esempio il respiro di Cheyne-Stokes e quando la respirazione è ostacolata da alcuni farmaci, come i barbiturici e gli oppiacei. Le metilxantine sembrano aumentare la sensibilità del centro respiratorio alle azioni stimolatorie di anidride carbonica, aumentando la ventilazione alveolare, riducendo la frequenza e la gravità degli episodi di apnea.

Se applicata sulla cute tramite cosmetici specifici (creme, gel), risulta utile nel trattamento delle adiposità localizzate. Inoltre è stato evidenziato, in una ricerca pubblicata sul "Journal of the American Medical Association", che nei bevitori di caffè patologie come il Parkinson si manifestano a un'età più avanzata. Da qui l'idea di un farmaco anti-Parkinson, di nuova generazione, che dal punto di vista chimico si basi sulla struttura della caffeina, a sua volta simile a quella dell'adenosina.

È noto che la caffeina aumenti la capacità di lavoro muscolare nell'uomo: ad esempio, l'ingestione di caffeina (6 mg/kg) aumenta le prestazioni degli sciatori, in particolare ad elevate altitudini. La tolleranza a quelli che sono gli effetti pressori della caffeina, trovata in studi clinici, può essere eterogenea e dipende dalla personale idiosincrasia di ciascun soggetto (*Farag et al., 2005*). In accordo con tale constatazione, un recente studio ha dimostrato che, tratti genetici legati ai polimorfismi nei recettori adenosinici A2a e nei recettori  $\alpha(2)$ -adrenergici potrebbero modificare la risposta in certi individui (*Renda et al., 2012*). Una serie di prove, nel corso degli ultimi 10-12 anni, hanno evidenziato inoltre che la caffeina aumenta la sensibilità dell'insulina del 15-30%, e che la ragione più importante è la compromissione dello smaltimento del glucosio nel muscolo scheletrico.

Nell'uomo l'escrezione avviene principalmente attraverso le urine (> 95 %): circa l' 1% di un quantitativo normale di caffeina negli adulti viene escreto, immodificato, tramite questa via. Anche nei neonati l'eliminazione della caffeina è principalmente renale, dove circa l'85% viene escreto immodificato, ma è molto più lenta che negli adulti a causa di funzioni epatiche e/o renali non ancora del tutto attive. Una piccola percentuale viene escreta anche tramite sperma e latte materno, ecco perché durante la gravidanza e

l'allattamento è consigliabile ridurre fortemente l'assunzione di caffè e degli altri alimenti ricchi in caffeina.

La visione globale sull'impatto che il caffè, e quindi le sostanze che lo compongono, ha sulla salute si è spostato da un'idea prevalentemente dannosa verso un probabile profilo benefico. I dati a favore di questa prospettiva ottimistica derivano dagli evidenti vantaggi derivanti dalla protezione al fegato, diabete e riduzione del rischio di Parkinson o le recenti osservazioni sulla mortalità globale. I dati sulla incidenza delle patologie tumorali sembrano, anch'essi, per lo più equilibrati verso un beneficio. Inoltre, la tradizionale descrizione del caffè come un fattore di rischio per l'ipertensione, l'osteoporosi o malattie cardiovascolari sembra svanire. Molti dei contrasti tra l'ex prevenzione e la visione attuale possono essere influenzati dalle associazioni passate degli effetti del caffè, dove attualmente si considera il numero insufficiente di studi clinici. Il successivo arrivo di nuovi e migliori dati clinici di qualità, insieme al miglioramento nella conoscenza dei componenti del caffè, come gli acidi fenolici, ha contribuito al cambiamento. Per cui l'etichettatura del caffè come bevanda prevalentemente dannosa manca di un sostegno alla luce delle attuali conoscenze. Va sottolineato che molto ancora deve essere conosciuto, e ciò richiede cautela nei casi in cui vi siano risultati, in termini di pressione sanguigna, aritmia e simili, costantemente associati con l'assunzione di caffè (*Cano-Marquina et al., 2013*).

### **1.6.3 Meccanismo d'azione della caffeina**

È ormai ampiamente riconosciuto che il principale meccanismo d'azione della caffeina, che si verifica a concentrazioni circolanti raggiunte dopo il consumo di una o due tazze di caffè, sia l'antagonismo a livello dei recettori adenosinici (*Fredholm 1980, 1995; Nehlig et al., 1992; Nehlig, Debry 1994*). Esistono quattro diversi sottotipi di recettori adenosinici, designati come adenosina A1, A2a, A2b e A3 (*Fredholm et al., 2001*). Gli studi farmacologici confermano che i recettori adenosinici mostrano una specializzazione per il legame a proteine quali Gi o Gs, e di conseguenza diminuiscono (A1 e A3) o aumentano (A2a e A2b) i livelli intracellulari dell'adenosin monofosfato ciclico (cAMP). I recettori adenosinici A1 e A2a sono i sottotipi coinvolti principalmente negli effetti della caffeina, mentre i recettori A2b e A3 svolgono solo un ruolo secondario. Gli A1 presentano una correlazione negativa all'adenil ciclasi, mentre gli A2a sono legati positivamente all'enzima. I recettori A1 sono ampiamente distribuiti in tutto il cervello con alti livelli nell'ippocampo, corteccia cerebrale e cerebellare e il talamo (*Daval et al.,*

1991; Fastbom et al., 1990; Goodman, Snyder 1982). Al contrario, i recettori A2a si trovano quasi esclusivamente nel corpo striato e nel tubercolo olfattivo (Jarvis, Williams 1989; Ongini, Fredholm 1996; Parkinson, Fredholm 1990). Ci sono prove dirette che evidenziano un'interazione funzionale tra i recettori adenosinici A2a e recettori dopaminici D2. Infatti, la somministrazione di agonisti del recettore adenosinico A2a riduce l'affinità della dopamina di legarsi ai recettori D2 in membrane dello striato (Ferre' et al., 1991). L'interazione tra i recettori A2a e recettori D2 nello striato potrebbe essere alla base di alcuni degli effetti comportamentali delle metilxantine. La caffeina porta all'inibizione e blocco dei recettori A2, determinando un potenziamento della neurotrasmissione dopaminergica (Ferre' et al., 1992; Garrett, Griffiths 1997; Pollack, Fink 1995). I recettori adenosinici citati sono espressi nella maggior parte dei tessuti, come il sistema nervoso centrale, l'endotelio vascolare, cuore, fegato, tessuto adiposo e muscolare. Di conseguenza, esiste una vasta gamma di potenziali risposte indotte dalla caffeina. Altri percorsi intracellulari associati ai recettori dell'adenosina comprendono la modulazione della fosfodiesterasi e la mobilitazione intracellulare del calcio, ma le concentrazioni necessarie per ottenere tali effetti sono di gran lunga superiori a quelli ottenuti dal semplice consumo di caffè (Riksen et al., 2011).

#### **1.6.4 La caffeina nell'ambiente acquatico**

La caffeina, farmaco biologicamente attivo, da circa un decennio viene riconosciuta come contaminante emergente dei sistemi d'acqua dolce e marini (Tabelle 1.4 e 1.5). A causa del suo elevato consumo da parte dell'uomo, è stata utilizzata come tracciante di contaminazione residua nei terreni e nelle acque superficiali (Seiler et al., 1999; Weigel et al., 2002). Sebbene le sue concentrazioni segnalate nei sistemi acquatici siano basse (dai ng/L a µg/L), gli effetti ecologici dannosi, non rilevati dai tradizionali test di tossicità, potrebbero essere riscontrati come risultato di una sua contaminazione. È stata rilevata nei fiumi e laghi (Buerge et al., 2003; Nakada et al., 2008; Komori et al., 2013, e molti altri), zone umide (Peeler et al., 2006), acque sotterranee (Nakada et al., 2008; Standley et al., 2008), estuari e baie (Siegener e Chen 2002; Peeler et al., 2006; Benotti e Brownawell 2007; Comeau et al., 2008; Ferreira 2005), e in altri sistemi marini (Weigel et al., 2002; Buerge et al., 2003; Singh et al., 2010; Knee et al., 2010). Inoltre diversi autori si sono concentrati su studi di acque adibite ad uso umano (Mompelat et al., 2011; Daneshvar et al., 2012, e altri). Di conseguenza, questo contaminante è stato descritto come uno dei rifiuti organici più comuni nelle acque naturali (Kölpin 2002).

**Tabella.1.4. Rappresentazione delle zone e concentrazioni di caffeina nei sistemi acquatici riportati in precedenti studi (Rodriguez del Rey et al., 2012).**

Location	Type of water	Concentration range	Source
North Sea	Sea	2 ng/L	Weigel et al. (2001)
Mediterranean Sea	Sea	ND-5 ng/L	Buerge et al. (2003)
Hanelai Bay, Kauai, Hawaii	Bay	ND-10 ng/L	Knee et al. (2010)
North Sea	Sea	2-16 ng/L	Weigel et al. (2002)
Miami River and Biscayne Bay, Florida	Estuary and bay	22-41 ng/L (Miami River); ND-12 ng/L (Biscayne Bay)	Cardinali and Zhao (2002)
Miami River, Key Largo Harbor, and Looe Key, Florida	Estuary, canal system, and offshore reef	13-68 ng/L (Miami River); 5.7-52 (Key Largo Harbor); ND-29 (Looe Key)	Singh et al. (2010)
Boston Harbor and Massachusetts Bay, Massachusetts	Estuary and bay	5-71 ng/L (Massachusetts Bay); 140-1600 ng/L (Boston Harbor)	Siegner and Chen (2002)
Tromso Sound, Norway; North Atlantic/Arctic Ocean	Ocean inlet; Ocean (10 km from coastline)	17-87 ng/L; 7-9 ng/L	Weigel et al. (2004)
Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil	Bay	134-147 ng/L	Ferreira (2005)
Sarasota Bay, Florida	Enclosed Lagoon	ND-166 ng/L	Peeler et al. (2006)
Halifax, Pictou, and Cocagne watersheds, Nova Scotia, Canada	Estuary	ND-1400 ng/L	Comeau et al. (2008)
Jamaica Bay, New York	Estuary	ND-~5000 ng/L	Benotti and Brownawell (2007)

ND = not detected.

**Tabella.1.5. Concentrazioni misurate di caffeina, a livello mondiale, in impianti di trattamento delle acque reflue (STP, WWTP), torrenti, fiumi, scarichi urbani (ME), acqua di mare (SW) e acqua dei laghi (Aguirre-Martínez et al., 2013).**

Pharmaceutical	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Place of study	Reference
Caffeine	0.01	SW	Weigel et al. (2004a)
	0.07	STP	Weigel et al. (2004a,b)
	0.09	SW	Weigel et al. (2004a)
	0.16	Creek	Yoon et al. (2010)
	0.25	River	Yoon et al. (2010)
	1.9	WWTP	Kosma et al. (2010)
	3.6	ME	Ternes et al. (1998)
	4.42	WWTP	Santos et al. (2005)
	6.0	WWTP	Kolpin et al. (2002)
	10.0	ME	Gagné et al. (2005)
	12.0	STP	Gómez et al. (2007)
	13.9	WWTP	Kosma et al. (2010)
	22.2	WWTP	Gagné et al. (2006)
	293.0	STP	Weigel et al. (2004a)

Ha una solubilità in acqua di 20 g/L e avendo un  $\log K_{ow}$  di -0,091 il bio- e geoaccumulo non sono attesi (UNEP 2002). Il  $K_{ow}$  rappresenta il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua che esprime la capacità di accumulo dei composti in fasi apolari. Secondo l'EPA (Environmental Protection Agency) i composti aventi il  $\log K_{ow}$  maggiore di 3.5 devono essere considerati potenzialmente pericolosi per l'ambiente. Ad esempio, il farmaco dal maggiore valore di  $\log K_{ow}$  è il 17- $\alpha$ -etinilestradiolo che ha valori pari a 4.

In base alle conoscenze che si hanno sulla teofillina, composto strutturalmente analogo alla caffeina, si può concludere che la caffeina risulta essere facilmente biodegradabile. Le fonti di apporto di caffeina più comunemente citate per i sistemi acquatici sono ad esempio gli scarichi degli impianti di trattamento delle acque reflue, fuoriuscita di liquami, acque sotterranee contaminate, eppure la sua presenza e concentrazione in questi sistemi sono scarsamente documentate. Di questi citati, lo scarico dagli impianti di trattamento ha ricevuto la maggiore attenzione, comunque gli altri sono sempre più riconosciuti come potenziali fonti (Buerge et al., 2006; Peeler et al, 2006; Nakada et al.,

2008; *Rounds et al.*, 2009). Le bevande che contengono caffeina, fondi di caffè, altri alimenti e prodotti farmaceutici possono entrare nel sistema delle acque reflue. Tutto ciò rappresenta un significativo carico di caffeina, in particolare se si tratta di aree densamente popolate. Ma gli apporti di caffeina ai corsi d'acqua naturali dagli scarichi di impianti di depurazione sono in funzione sia del suo consumo, dipendente dalla popolazione e dalle abitudini di consumo, sia dall'efficienza di eliminazione degli impianti locali di trattamento delle acque. L'eliminazione in questo caso può interessare una piccola percentuale di caffeina presente, ma l'efficienza di eliminazione può essere molto variabile a seconda dei processi di trattamento impiegati, tempo di ritenzione idrica, condizioni ambientali come temperatura e intensità della luce, e proprietà fisiche che includono la capacità di assorbimento dei composti sui fanghi (*Carballa et al.*, 2004; *Lin et al.*, 2009). *Buerge et al.* (2006) riportarono l'efficienza di rimozione della caffeina dall'81% a >99% negli impianti di trattamento delle acque svizzeri e *Lin et al.* (2009) hanno riportato un'efficienza dell'85-100% da quattro impianti taiwanesi. Per quanto riguarda gli impianti negli Stati Uniti, *Siegener e Chen* (2002) e *Benotti e Brownawell* (2007) hanno riportato tassi di rimozione del 67% nel porto di Boston, Massachusetts e il 64% nella baia Jamaicana e New York. Queste stime si basano su impianti di trattamento di acque reflue i quali impiegano trattamenti secondari (es. filtrazione biologica). L'efficienza di rimozione diminuisce notevolmente utilizzando processi di trattamento meno avanzati. Ad esempio, *Weigel et al.* (2004) hanno segnalato un'efficienza di rimozione del 13% in un impianto di trattamento che utilizzava una filtrazione meccanica senza trattamento biologico. La caffeina presente in acque sotterranee contaminate può essere scaricata nei sistemi marini, e ciò è stato dimostrato da *Peeler et al.* (2006) nella baia di Sarasota, in Florida. La sua presenza nelle acque sotterranee può provenire da perdite nelle linee fognarie (*Nakada et al.*, 2008) o dal percolato dei sistemi di trattamento delle acque reflue in loco (*Buerge et al.*, 2006; *Peeler et al.*, 2006). L'efficienza di rimozione in questi sistemi in loco può variare a seconda del tipo di trattamento impiegato (ad esempio biofiltri o filtri a sabbia). Condizioni ambientali quali temperatura, salinità, pH, attività microbica in acque costiere aperte possono portare a una maggiore stabilità di contaminanti, come anche la caffeina (*Weigel et al.*, 2001). Pertanto, le acque vicino alla costa possono effettivamente essere esposte alla contaminazione da caffeina. Un dato interessante relativo a questo contaminante emergente riguarda il fatto che è stato isolato da gorgonie delle specie *Echinogogia pseudossapo*, *Paramuricea chamaeleon*, *Echinomuraceae splendens* come parte di una ricerca che studia prodotti naturali da

organismi marini (*Jingyu et al., 1984; Imre et al., 1987; Parameswaran et al., 2002*). Poiché si tratta di scoperte isolate, non è noto se questa rappresenta una fonte comune o significativa di caffeina per i sistemi marini.

### **1.6.5 Effetti della caffeina sugli organismi acquatici**

Test convenzionali di tossicità suggeriscono che gli attuali livelli di caffeina rappresentano un rischio trascurabile per gli organismi acquatici (*Quinn et al., 2008; Moore et al., 2008*). Tuttavia la caffeina è un farmaco biologicamente attivo con molti bersagli molecolari noti, e alcuni studi, ricorsi a saggi meno tradizionali, indicano che può avere effetti sugli organismi acquatici che effettivamente non vengono evidenziati dai test di tossicità convenzionali (*Gagne et al., 2006; Pollack et al., 2009*).

La tossicità acquatica acuta è stata determinata per i pesci (*Leuciscus idus* LC<sub>50</sub> (96h) 87 mg/L), per gli invertebrati acquatici (*Daphnia magna* EC<sub>50</sub> (48h) 182 mg/L) e per le alghe (*Scenedesmus subspicatus* ErC<sub>50</sub> (72h), ErC<sub>10</sub> (72h) >100 mg/L) (Concentrazione effettiva media, EC<sub>50</sub>: si intende la concentrazione di una sostanza tossica in grado di produrre, per un determinato tempo di trattamento, ad esempio 4, 12, 24, 48, 96 ore, un'incidenza pari al 50% dell'effetto scelto sugli organismi utilizzati in prova. Concentrazione letale media, LC<sub>50</sub>: è la concentrazione che provoca la morte del 50% degli organismi utilizzati in prova dopo periodi di tempo specifici). Occorre comunque puntualizzare che le concentrazioni di caffeina utilizzate in questi studi erano nettamente superiori rispetto alle più alte concentrazioni segnalate nei sistemi marini o di estuario.

Rodriguez del Rey in uno dei suoi lavori (2010) ha voluto osservare la presenza e la concentrazione di caffeina nelle acque della costa dell'Oregon e quelli che potevano essere i potenziali effetti sui mitili dominanti nella zona, *Mytilus californianus*. Dalle sue analisi è emerso che i mitili, esposti in laboratorio a concentrazioni ambientali rilevanti di caffeina, mostravano una risposta a livello delle Hsp70, le quali offrono protezione cellulare in seguito ad aggressioni ambientali. La durata di questo esperimento è stata limitata a 30 giorni e non è chiaro come le Hsp70 nel tessuto branchiale o altri tessuti possano rispondere in seguito ad una sostenuta esposizione cronica a basse concentrazioni di caffeina. Non è da escludere che la caffeina possa esasperare gli effetti dello stress da altre sollecitazioni ambientali, inclusi altri contaminanti.

Uno studio di Lawrence del 2012 ha messo in evidenza gli effetti della caffeina sulla comunità di biofilm fluviale in Canada. I risultati di tossicità per la caffeina, espressa come concentrazione effettiva media, indicano elevati livelli di 182 mg/L per *Daphnia*

(Solomon *et al.*, 1996) e da 600 a 700 mg/L per lo zooplancton (Fent *et al.*, 2006). Al contrario, uno studio su *Lemna gibba* (Brun *et al.*, 2006) ha trovato una concentrazione effettiva media più bassa, pari a 1 mg/L. L'ampia, rapida degradazione della caffeina suggerisce che il suo maggiore effetto possa essere come nutriente piuttosto che come tossina: se agisse come fonte di nutrienti, ci si aspetterebbe una stimolazione della comunità microbica. È stato osservato un effetto negativo e ciò può essere collegato ad un concomitante aumento del numero di micrometazoi e protozoi erbivori, in particolare nelle esposizioni a caffeina. Questi erbivori sono importanti ingegneri ecosistemici e possono causare cali drastici nella biomassa del biofilm, spessore, e attività in periodi di tempo brevi (Jones *et al.*, 1994). La rapidità con cui il biofilm è stato pascolato potrebbe spiegare il calo delle alghe e della biomassa batterica e spiegare perché la caffeina non ha avuto un effetto stimolatorio-nutriente (Mohamed *et al.*, 1998).

Tanti sono gli organismi che sono stati sottoposti a studi per verificare quelli che potevano essere gli effetti in seguito all'esposizione alla caffeina, come ad esempio uno recente di Aguirre-Martinez sulla specie di granchio europeo *Carcinus maenas*, dove è stata osservata la sua suscettibilità a questa sostanza con la valutazione di parametri cellulari e biochimici. I granchi sono stati esposti a diverse concentrazioni di caffeina pari a 15 µg/L e in seguito a ciò hanno presentato uno stress generale, mentre quelli esposti a 50 µg/L hanno presentato una diminuzione nello stato di salute. Inoltre l'esposizione a caffeina ha attivato enzimi di biotrasformazione, alterato lo stato di ossidazione delle cellule, provocato stress ossidativo, e danno al DNA (Aguirre-Martínez *et al.*, 2013).

L'obiettivo di uno studio condotto sulla specie di vongola *Ruditapes philippinarum* era quello di analizzare il benessere cellulare, per indicare lo stato di salute dopo l'esposizione a diverse concentrazioni ambientali di prodotti farmaceutici, tra cui la caffeina, utilizzando la stabilità della membrana lisosomiale (LMS) come indicatore biologico. Il range farmaceutico testato (0-50 µg/L) è stato in grado di destabilizzare la membrana lisosomiale, in generale dipendente dalla dose e dal tempo. Il danno lisosomiale, valutato nell'emolinfa di *R. philippinarum*, costituisce uno strumento sensibile per la valutazione all'esposizione a concentrazioni ambientali di caffeina e altre sostanze, in condizioni di laboratorio. L'LMS è considerato un biomarcatore adatto per la contaminazione farmaceutica in ambienti acquatici, data la sua capacità di dimostrare effetti contaminanti dannosi (Aguirre-Martinez *et al.*, 2013).

Per alcuni organismi acquatici invece la caffeina non risulta essere tossica (> 100 mg/mL) come testato da Pruvot *et al.* nel 2012 sulle larve di zebrafish. Nelle acque superficiali

però le concentrazioni di caffeina sufficienti per indurre una significativa mortalità e difetti nello stadio di sviluppo di questi organismi sono pari a 1,6 mM (Mompelat et al., 2009). Ulteriori indagini saranno necessarie per valutare appieno l'impatto di questo nuovo tipo di inquinamento sulla fauna acquatica e, eventualmente anche sugli esseri umani.

## 1.7 I BIOMARKER

Grazie alla necessità di un'ampia ed accurata valutazione e monitoraggio ambientale, l'ecotossicologia, allo stato attuale, presenta come sfida lo sviluppo di strumenti convenienti, più sensibili ed affidabili, con un'elevata rilevanza biologica ed ecologica, in grado di poter rilevare in anticipo eventuali impatti prima che un disturbo irreversibile si possa verificare nell'ecosistema (Walker 1998; Wadhia e Thompson 2007). Questi strumenti fanno riferimento soprattutto a funzioni fisiologiche e biochimiche degli animali e sono indicati come biomarker.

Gli inquinanti, ma soprattutto microinquinanti quali i prodotti farmaceutici, a concentrazioni ambientali non sempre provocano effetti letali sulla vita degli organismi. Tuttavia, l'induzione di cambiamenti nel loro ciclo vitale, riproduzione, crescita o vari gradi di deformità anatomiche (Jjemba 2006), possono portare ad una diminuzione nelle performance biologiche delle popolazioni selvatiche e, nei peggiori casi, anche alla loro estinzione. A questo proposito è stato dimostrato come confrontando gli effetti di alcuni farmaci sugli endpoint del ciclo vitale e su una batteria di biomarker, la sensibilità degli endpoint aumenta anche di 1000 volte. Quinn et al. (2011) dimostrano questo in un lavoro condotto sul mitilo di acqua dolce *Dreissena polymorpha*.

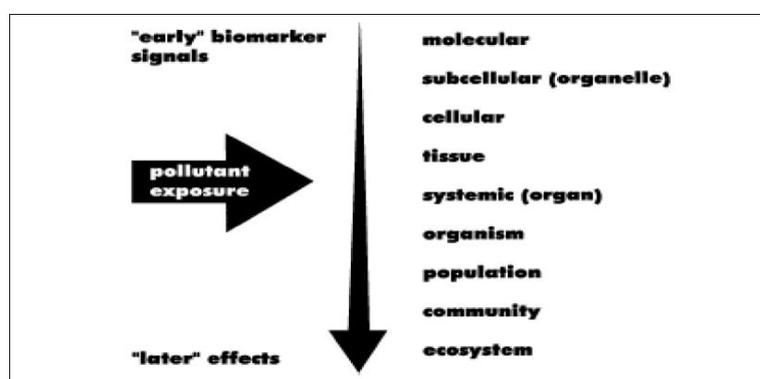


Fig.1.12. Schematizzazione della sequenza temporale con cui un inquinante induce risposte in un sistema biologico (Van Der Oost et al., 2003).

I biomarker sono definiti come quelle variazioni biochimiche, cellulari o fisiologiche che possono essere misurate in un organismo come risposta all'esposizione a composti inquinanti (*Livingstone et al., 1997*), in quanto il primo effetto di un composto inquinante si manifesta a livello biochimico/molecolare. La rilevazione precoce di una contaminazione può aiutare ad evitare che l'eventuale danno possa estendersi anche a livelli superiori dell'organizzazione biologica (*Munkittrick e McCarthy, 1995*). Nel caso di uno screening ambientale, i biomarker dovrebbero servire per compiere un'indagine preliminare (sistemi di "early warning") volta a mettere in evidenza la presenza di una sostanza xenobiotica e prevedere l'impatto che questa potrebbe avere sull'ambiente, utilizzandone eventualmente una "batteria" nel caso non si conosca esattamente il tipo di contaminazione (*Payne et al., 1987*). I biomarker sono sempre più spesso impiegati utilizzando organismi direttamente esposti all'ambiente da studiare, caratteristica che può però rappresentare anche uno svantaggio, in quanto talvolta risulta difficile distinguere tra una risposta biochimica causata da stress ambientali (come variazioni della temperatura o della disponibilità di cibo) ed una invece dovuta ad uno stress causato dalla presenza di uno o più inquinanti. Per questo motivo, è necessario conoscere approfonditamente la biologia e la fisiologia dell'organismo utilizzato, per poter minimizzare la probabilità di incorrere in errori di valutazione dovuti a cause diverse dall'esposizione ad uno xenobiotico (*Stegeman et al., 1992*). E' necessario conoscere inoltre i dati sull'attività basale dei biomarker considerati, anche in relazione ai fattori abiotici cui gli organismi sono sottoposti, in modo da poter distinguere le variazioni naturali da stress indotti dall'inquinamento. Quando un composto tossico penetra in un ecosistema, sia questo marino, terrestre o d'acqua dolce, esso può provocare una serie d'alterazioni o danni a diversi livelli di complessità strutturale che vanno dal danno molecolare, fino a giungere ad alterazioni a livello di organismi, popolazioni o comunità (*Stebbing, 1985*). I biomarker possono essere suddivisi in tre classi:

- Biomarker di esposizione: segnalano risposte relative alla prima interazione tra la molecola (inquinante o suo metabolita) ed il recettore biologico. Tramite quest'indice si individua l'avvenuta esposizione al contaminante.
- Biomarker di effetto: segnalano come un organismo, una popolazione o una comunità siano soggette ad effetti tossicologici da parte di uno o più inquinanti. Includono misure a livello biochimico, fisiologico o altre interazioni all'interno dei tessuti o fluidi corporei.

- Biomarker di suscettibilità: indicano la capacità intrinseca o acquisita di un organismo di rispondere ai cambiamenti in seguito ad esposizione a specifiche sostanze, includendo fattori genetici e cambiamento dei recettori che alterano la suscettibilità di un organismo all'esposizione.

I biomarker possono essere divisi anche in funzione della loro "specificità" di risposta nei confronti d'agenti inquinanti in:

- Biomarker specifici: quelle risposte molecolari e biochimiche che si manifestano in un organismo come risposta ad una specifica classe di contaminanti (ad esempio metallotioneine in risposta all'inquinamento da metalli). In questo caso la risposta di difesa è estremamente specifica e indica chiaramente la classe di sostanze responsabile della contaminazione.
- Biomarker generali: quelle risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico, che non possono essere ricondotte ad una specifica classe d'inquinanti, ma rappresentano lo stato generale di stress dell'organismo (certi danni al DNA, i disordini immunitari, gli indici somatici, la stabilità della membrana lisosomiale ecc..).

Attraverso l'utilizzo dei biomarker possiamo individuare la presenza di particolari inquinanti con i biomarker specifici, o semplicemente uno stato di sofferenza degli organismi attraverso i biomarker generali. I biomarker possono essere applicati su tre livelli gerarchici nei programmi di biomonitoraggio (*McCarthy & Shugart, 1990*): il primo stadio è rappresentato dall'identificazione del pericolo, tale approccio è applicato quando non si conosce la composizione della miscela contaminante. L'individuazione del pericolo è diagnosticata con l'utilizzo dei biomarker generali, e attraverso questa è possibile individuare la presenza o assenza di un rischio chimico. Il secondo stadio è la valutazione del pericolo, che si attua quando conosciamo a priori i potenziali inquinanti. In questa utilizzando i biomarker specifici è possibile identificare le classi dei contaminanti presenti, l'estensione e la gravità dell'area di contaminazione. L'ultimo stadio è la previsione del rischio, dove le risposte dei biomarker possono suggerire potenziali conseguenze negative a lungo termine a livello di popolazione e di comunità.

Una classificazione generale dei biomarker, intesi come alterazione della fisiologia dell'organismo, distingue le seguenti categorie (*McCarthy et al., 1991*):

- alterazione del DNA;
- risposte in termini d'induzione/inibizione della sintesi di proteine;

- variazioni del sistema immunitario;
- alterazioni istopatologiche.

I biomarker sono definiti indicatori che forniscono, nel breve termine, risposte che rappresentano potenziali effetti biologici a lungo termine (*McCarthy and Shugart, 1991*).

La Commissione Europea, attraverso la Marine Strategy Framework Directive (2008/56/EC) (MSFD), ha stabilito i criteri e le metodologie standard per assicurare un approccio coerente di valutazione del Good Environmental Status (GES) ovvero la buona qualità dell'ambiente, avvalendosi non solo del supporto scientifico di ICES e JRC, ma anche di precedenti scoperte. Il Descrittore 8 della Direttiva riguarda la necessità di assicurare che le concentrazioni dei contaminanti presentino livelli che non diano origine a effetti inquinanti. Il raggiungimento del GES si dovrebbe quindi basare su programmi di monitoraggio che determinino le concentrazioni degli inquinanti e allo stesso tempo conducano analisi biologiche inerenti gli effetti degli inquinanti sugli organismi marini (JRC, 2010). Tutto ciò richiede l'utilizzo di un insieme di metodologie convenzionali e altre più innovative al fine di ottenere un approccio più potente. Il biomonitoraggio mediante l'utilizzo dei biomarker fornisce informazioni addizionali a quelle ricavate dal monitoraggio chimico o tossicologico. Facendo ricorso ai biomarker è possibile ottenere informazioni più accurate sugli effetti dei farmaci di interesse a concentrazioni ambientali nell'ordine dei ng-µg/L, fondamentali per predire come la presenza dei farmaci nell'ambiente acquatico possa determinare delle conseguenze ecologiche (*Schmidt et al., 2011*).

Tra i numerosi biomarker esistenti, possiamo citare:

-il Neutral red retention assay (NRRA): permette la valutazione della stabilità lisosomiale degli emociti (Lysosome Membrane Stability, LMS), descritto da Lowe *et al.*(1995). In base a questo saggio è possibile valutare gli effetti citotossici di una determinata sostanza sugli organismi, in quanto evidenzia una risposta fisiologica dell'organismo all'esposizione ad un agente inquinante.

-Danno al DNA: indica la presenza di agenti genotossici.

-Rapporto lisosomi/citoplasma, dove l'ingrandimento dei lisosomi indica tossicità cellulare. L'aumento del volume lisosomiale è stato associato alla destabilizzazione delle membrane o all'incremento della permeabilità delle stesse.

-Accumulo di lipidi neutri nei lisosomi: tale alterazione del metabolismo è in genere correlata ad una alterazione dello stato redox cellulare, e può essere messa in evidenza con una opportuna colorazione.

-Accumulo di lipofuscine nei lisosomi: l'alterazione dello stato redox dei lisosomi è segnalato dall'accumulo di lipofuscine. Queste ultime sono pigmenti di derivazione lipidica presenti all'interno dei lisosomi, che si originano dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi di cui sono ricchi i tessuti.

-Attività del Glutatione S-transferasi (GST): è l'enzima coinvolto nella fase II della detossificazione, il quale indica l'attivazione dei processi di detossificazione.

-Attività della Catalasi (CAT): enzima antiossidante coinvolto nella detossificazione, indica che vi è in atto uno stress ossidativo.

-Attività della Acetilcolinesterasi (AChE): enzima appartenente alla classe delle idrolasi, presente nel tessuto nervoso di tutti i gruppi animali che catalizza l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina, indicatore di neurotossicità.

-Attività della Superossido Dismutasi (SOD): enzima antiossidante, indica stress ossidativo.

-Concentrazione di Malondialdeide (MDA): composto intermedio della perossidazione lipidica.

-Metallothioneine: indicano esposizione a metalli.

Il laboratorio di Fisiologia e Biochimica ambientale del CIRSA dell'Università di Bologna a Ravenna, presso il quale è stato realizzato il lavoro presentato nella seguente tesi di laurea, dispone delle conoscenze necessarie all'analisi della batteria dei biomarker elencati precedentemente. In questo studio i biomarker sono stati utilizzati per identificare eventuali alterazioni provocate nei mitili, *Mytilus galloprovincialis*, dall'esposizione in vasche alla caffeina (si veda lo Scopo della Ricerca).



# **2.SCOPO DELLA RICERCA**

La diffusa presenza dei residui dei farmaci ad uso umano e veterinario nelle acque superficiali e in ambiente marino, nonché nelle acque potabili, ha sollevato preoccupazione per la salute della fauna acquatica e per un eventuale rischio per gli esseri umani (*Christensen et al., 2009*).

Dopo l'assunzione a scopo terapeutico, i farmaci vengono in parte escreti come tali ed in parte come metaboliti, e raggiungono gli ecosistemi acquatici in quanto spesso risultano resistenti ai processi convenzionali di trattamento delle acque (*Santos et al., 2010*). Essendo continuamente aggiunti e non efficacemente rimossi, alcuni farmaci mostrano una significativa pseudo-persistenza e concentrazioni ambientali costanti di ng- $\mu$ g/L. A fronte dei risultati di test ecotossicologici effettuati con protocolli ed organismi standard, per molti anni si è ritenuto che a concentrazioni al di sotto dei mg/L la presenza dei farmaci in ambiente acquatico non rappresentasse un rischio. A tutt'oggi quindi non sono presenti normative che regolano la immissione in ambiente di queste sostanze o pongono dei limiti all'uso (ad esempio irriguo o potabile) dell'acqua contaminata da farmaci. Tuttavia, i farmaci sono molecole disegnate per essere biologicamente attive su bersagli specifici. La letteratura scientifica evidenzia da alcuni anni che, seppur presenti in ambiente acquatico soltanto in tracce, alcuni determinano effetti significativi sugli organismi acquatici, sia per quanto riguarda lo stato di salute in generale ma anche su funzioni nervose, endocrine e riproduttive, anche a concentrazioni molto basse, inferiori ai ng/L (*Franzellitti et al., 2011*). Molte specie acquatiche possiedono infatti target molecolari simili all'uomo, con i quali i farmaci interagiscono in modo specifico ed a basse concentrazioni. Inoltre per alcuni farmaci è nota la capacità di bioaccumulo nei tessuti di molluschi e pesci, pertanto non solo gli effetti possono svilupparsi secondariamente in determinate condizioni o fasi di sviluppo, ma anche l'uomo può divenire esposto ai farmaci ambientali (*Brooks et al., 2005; Daughton e Brooks, 2011; Menningen et al., 2011*).

A fronte di queste evidenze, è stata posta maggiore attenzione al problema della presenza dei farmaci in ambiente acquatico. Poiché non è possibile ridurre l'uso terapeutico, è opportuno mirare le strategie verso un miglioramento degli impianti di depurazione e l'introduzione sul mercato di farmaci più ecocompatibili. Le molecole terapeutiche sono di varia natura chimica, e quindi servono depuratori con diverse caratteristiche; anche la produzione di farmaci più ecocompatibili va mirata alla sostituzione di quei farmaci che, al contrario, sono molto persistenti ed attivi sugli organismi non bersaglio. Quindi le risposte industriali e le normative necessitano di essere guidate attraverso la

identificazione di quali sono i farmaci di “maggiore preoccupazione” intendendo con questo 1) quelli maggiormente persistenti e bioaccumulabili, 2) quelli presenti a maggiore concentrazione in ambiente, e 3) quelli per i quali sono dimostrati effetti su organismi non bersaglio a concentrazioni ambientali (*Christen et al., 2011*). La ricerca scientifica sta svolgendo questo compito, e il presente lavoro intende contribuire al punto 3) per quanto riguarda la caffeina.

Ampiamente usata sia come costituente di bevande che come farmaco (contrastata il mal di testa, potenzia l'effetto antidolorifico di analgesici, attenua alcuni effetti depressivi di altri farmaci), la caffeina è un contaminante diffusamente presente nelle acque superficiali, e dove cercata è presente a concentrazioni di ng- $\mu$ g/L anche nelle acque marine costiere. Il presente lavoro di tesi si propone quindi di studiare il possibile effetto della caffeina sui mitili, *Mytilus galloprovincialis*. Sfruttando le ampie conoscenze disponibili in letteratura circa le risposte dei mitili ai contaminanti ambientali, i mitili sono stati esposti in acquario a caffeina (5, 50 e 500 ng/L) per 7 giorni e poi analizzati attraverso una batteria di otto biomarker, alterazioni fisiologiche o biochimiche che forniscono informazioni circa lo stato di salute degli animali.

La scelta della caffeina è stata fatta in quanto nel laboratorio sono stati studiati in particolare gli effetti di farmaci che interferiscono con il sistema di trasduzione del segnale AMPc dipendente, carbamazepina, propranololo e fluoxetina, a cui si aggiunge ora la caffeina.

La scelta delle concentrazioni è stata fatta nel range ambientale, il tempo di esposizione è lo stesso utilizzato dal laboratorio per lo studio di carbamazepina, propranololo e fluoxetina, che in soli 7 giorni hanno indotto potenti effetti nei mitili.

Gli obiettivi della ricerca si possono così riassumere:

- individuare se l'esposizione per 7 giorni a caffeina alle concentrazioni ambientali induce alterazioni nello stato di salute dei mitili
- confrontare gli eventuali effetti con quelli di altri farmaci, nelle stesse condizioni sperimentali
- catalogare la caffeina tra i contaminanti acquatici di bassa, media o elevata preoccupazione



# **3. MATERIALI E METODI**

### 3.1 IL MITILO MEDITERRANEO, *Mytilus galloprovincialis*

La specie utilizzata per l'esperimento riguardante questa tesi è il mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis*, appartenente alla classe dei bivalvi, all'interno del phylum dei molluschi (Fig. 3.1). Questi organismi fanno parte della fauna bentonica di tipo sessile che vivono adesi a substrati duri dell'intertidale per mezzo del bisso, costituito da filamenti di natura corneo-elastica prodotti dall'animale stesso.



Fig.3.1. Esemplare di *Mytilus galloprovincialis*. A sinistra si vedono molto chiaramente i filamenti del bisso. A destra invece, in un esemplare con le valve aperte, viene indicata una delle ampie branchie a lamella di questi organismi.

Esternamente l'animale presenta una conchiglia composta da due valve generalmente simmetriche, di colore nero violaceo, con lo scopo di proteggere le viscere. Le valve sono compresse latero-lateralmente e tenute insieme da un legamento, detto cerniera, che articolandosi permette la loro apertura, ed è sotto il diretto controllo di muscoli adduttori, due anteriori uno posteriore, inseriti nella parte interna delle valve. Sono costituite da una matrice organica formata da mucopolissacaridi, proteine e cristalli di carbonato di calcio, generalmente sotto forma di calcite (cristalli esagonali) o aragonite (cristalli rombici). Il legamento è costituito soprattutto da conchiolina, sostanza analoga alla chitina e presenta uno strato esterno e uno interno, che per la loro elasticità tendono a provocare l'apertura della conchiglia. Il meccanismo di apertura e chiusura delle valve, definito comunemente *catch*, permette all'animale di trattenere il volume d'acqua necessario alla sopravvivenza nelle fasi di emersione. Dalla chiusura delle loro valve dipende inoltre la possibilità di potersi difendere dai predatori in mare, quali gasteropodi carnivori, alcune specie di stelle marine e qualche specie ittica, soprattutto grossi sparidi come l'orata. Internamente le valve sono ricoperte dal mantello, costituito da un tessuto molle che svolge un ruolo fondamentale nella sopravvivenza dell'organismo grazie all'accumulo di sostanze di riserva utilizzate soprattutto durante il processo di maturazione delle gonadi. La bocca,

subterminale, è una fenditura trasversale le cui labbra si prolungano su entrambi i lati dell'orifizio in due paia di tentacoli labiali, lamine appiattite a forma di foglia di alloro.

Le branchie, situate in una cavità del mantello garantiscono gli scambi gassosi e permettono la captazione delle particelle alimentari in sospensione. L'escrezione si realizza attraverso le branchie e il rene. La filtrazione avviene per mezzo di un flusso unidirezionale di acqua garantito dalla presenza di un sifone inalante nella regione ventrale, che pompa l'acqua all'interno della cavità del mantello esponendola alla superficie branchiale, ed un sifone esalante, vicino al muscolo adduttore posteriore, con cui l'acqua viene espulsa all'esterno dopo aver captato l'ossigeno disciolto in essa e le particelle alimentari. L'ano si apre al di sotto del muscolo adduttore posteriore.

L'apparato digerente dei molluschi bivalvi consta di un esofago, breve tubo che sbocca in un ampio stomaco, a pareti pieghettate, crivellato di fori che sono gli orifizi dei diverticoli digerenti. Lo stomaco si presenta come un lungo diverticolo cieco (il cieco dello stilo) contenente lo stilo del cristallino, sottile fusto trasparente che va a poggiarsi su uno scudo gastrico. Tale stilo ha una dimensione notevole rispetto a quella del mollusco, mosso da ciglia vibratili, gira su se stesso (da 10 a 80 volte al minuto), liberando enzimi digestivi. L'intestino è relativamente lungo, più o meno ripiegato su se stesso, e nel suo percorso attraversa il ventricolo cardiaco prolungandosi fino al retto per sboccare nell'ano. L'alimento principale è costituito da plancton e particelle organiche in sospensione. In condizioni normali, un mitilo di media dimensione, filtra all'incirca da 4 a 5 litri d'acqua all'ora, ed è in grado di trattenere il 90% delle particelle contenute in essa, sempre se le dimensioni risultano filtrabili. Per mezzo delle ciglia laterali delle branchie, e del loro battito, si crea la corrente alimentare inalante. Il mitilo è in grado di captare in modo molto efficiente le particelle con diametro compreso tra i 2 e i 5 micron.

Il sistema circolatorio è di tipo aperto dove il sangue inonda i tessuti formando un sistema lagunare in parte del suo percorso. I molluschi sono animali a sangue freddo e quindi la loro temperatura corporea si adatta a quella dell'ambiente.

Il sistema nervoso è costituito da gangli pari e da commisture anastomizzate che permettono l'innervazione dei diversi distretti corporei.

I sessi sono separati e la fecondazione, esterna, si realizza in mare casualmente. Le femmine producono nelle ovaie una sostanza che, spargendosi nell'acqua di mare, provoca l'eiaculazione nei maschi vicini e, a sua volta, lo sperma eiaculato nell'acqua scatena nelle femmine la deposizione delle uova.

Meglio conosciuti come cozze, in Italia è una specie presente ed intensamente allevata, diverso ed allo stesso tempo difficilmente distinguibile dal congenere atlantico *M. edulis*. Essendo organismi filtratori ed accumulatori di eventuali inquinanti di diverse tipologie, sono ampiamente utilizzati come bioindicatori. Sono quindi degli ottimi “campanelli d’allarme” dello stato ambientale, quando opportunamente monitorato. Essendo facilmente allevabili in condizioni di laboratorio, sono spesso impiegati in test ecotossicologici per determinare eventuali correlazioni tra la presenza di specifici inquinanti nelle acque costiere e l’alterazione dei processi biologici.



Fig.3.2. Colonia di *Mytilus galloprovincialis*.

### **3.2 ESPOSIZIONE DEI MITILI AL TRATTAMENTO CON CAFFEINA**

I mitili utilizzati nel seguente studio derivano da un allevamento situato a largo delle coste di Cesenatico, Ravenna, e sono stati forniti dalla Cooperativa Copralmo. Sono mitili di classe A, atti alla commercializzazione. Il farmaco utilizzato negli esperimenti di esposizione è la caffeina [1,3,7-trimetil-1*H*-purin-2,6(3*H*,7*H*)-dione].

Sulla base dei dati di bibliografia relativi alle concentrazioni del composto rilevati in diversi comparti idrici, sono stati allestiti 3 trattamenti sperimentali corrispondenti a concentrazioni di caffeina pari a 5 ng/L, 50 ng/L e 500 ng/L.

Il contaminante è stato somministrato giornalmente per la durata complessiva di 7 giorni, insieme alla somministrazione del mangime per filtratori (Coral Diet, Filtrator, Xaqua, Italy), dopo il cambio dell'acqua.

Ogni trattamento è stato realizzato in triplicato all'interno di 3 vasche per condizione contenenti 20 individui ciascuna in un volume complessivo di 10 litri d'acqua di mare mantenuta in condizioni costanti di areazione e temperatura (16°C).

Per non alterare il ritmo circadiano dei mitili è stato inoltre riprodotto artificialmente il fotoperiodo naturale del periodo dell'anno corrispondente al prelievo. Sono state previste anche tre vasche di controllo in cui i mitili non sono stati esposti al farmaco.



**Fig.3.3. Vaschette contenenti i mitili esposti a caffeina.**

Conclusi i sette giorni di esposizione alla caffeina, e prima di iniziare con l'esperimento, è stata prelevata l'emolinfa dei mitili per il test del Neutral Red (vedi avanti). Successivamente si è proceduto alla dissezione degli organismi con il prelievo di ghiandola digestiva e branchie che sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

Per la valutazione del rapporto lisosomi/citoplasma, dei lipidi neutri e delle lipofuscine, sono state prelevate le ghiandole di 4 mitili per vasca, trasferite sui rispettivi supporti di alluminio e posizionate sui chunks (supporti metallici per le analisi al criostato), congelate con N-esano raffreddato in azoto liquido e immediatamente conservate a -80°C. Queste saranno utilizzate per le analisi dei biomarkers al criostato, come vedremo più avanti.

### **3.3 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY (NRRA)**

Questo particolare metodo permette di valutare gli effetti citotossici di una sostanza sugli organismi in quanto si basa sul principio che il colorante (neutral red) somministrato agli emociti vitali viene immagazzinato all'interno dei lisosomi e trattenuto per un certo periodo di tempo, che può arrivare fino a 180 minuti quando le cellule sono in buono stato di salute.

Danni alla membrana, causati dall'impatto di agenti citotossici, diminuiscono i tempi di ritenzione del neutral red che viene disperso all'interno del citosol, eventualmente insieme alla fuoriuscita delle sostanze contenute all'interno dei lisosomi. L'emolinfa si preleva dal muscolo adduttore dei mitili utilizzando una siringa ipodermica da 2,5 mL contenente una piccola quantità di soluzione fisiologica salina. Successivamente, vengono preparati i vetrini sui quali si distribuiscono 5  $\mu$ L di poli-L-lisina allo 0,1%, per far aderire gli emociti, e si aggiungono 40  $\mu$ L di emolinfa ponendoli al centro del vetrino. Si lasciano aderire le cellule al vetrino per 30 minuti in una camera umida ed infine si aggiungono 40  $\mu$ L di una soluzione allo 0,01% di neutral red in corrispondenza dello strato di emociti adesi al vetrino e si lascia in incubazione per 15 minuti. I vetrini vengono poi osservati al microscopio ottico (Zeiss, Axioscop 40) ogni 15 minuti fino a quando più del 50% delle cellule mostra una perdita di colorante dovuto alla destabilizzazione delle membrane lisosomiali o anomalie come un ingrandimento cellulare (Moore *et al.* 2008). Questo dato viene registrato e permetterà il calcolo della % di lisosomi destabilizzati nei controlli e negli animali esposti.

### **3.4 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA**

Per l'analisi del rapporto lisosomi/citoplasma è necessario posizionare i chunks all'interno del criostato (Microm, HM505 N) ed effettuare delle sezioni delle ghiandole, di spessore di 10  $\mu$ m. Le sezioni, una volta disposte sui vetrini, vengono immerse in una vaschetta di Hellendal contenente una soluzione di Polypep al 7% e Naftol allo 0,04% per 20 minuti e si porta a volume con il buffer citrato 0,1M a pH 4.5. La vaschetta si mette a bagnomaria a 37°C. Successivamente si elimina il Polipep+Naftol e si effettuano dei lavaggi con NaCl 3% a temperatura ambiente: una volta eliminato quest'ultimo, si versa una soluzione satura di Fast Violet in buffer fosfato 0,1M a pH 7.4. Dopo aver lasciato al buio per una decina di minuti si elimina il Violet e si lava con H<sub>2</sub>O corrente. I vetrini si

mettono ad asciugare all'aria e si fissano con gel di glicerina. Il giorno successivo si procede all'analisi delle sezioni di ghiandola con microscopio ottico effettuando delle fotografie (5 per ghiandola) da utilizzare per l'analisi d'immagine. Quest'ultima permette la determinazione della colorazione assunta dai lisosomi a seguito della reazione dell'enzima N-Acetyl- $\beta$ -esosaminidasi con il substrato Naftol. L'analisi d'immagine, eseguita con il software "ScionImage 4.0" permette di stabilire il rapporto tra le regioni colorate di ogni sezione di ghiandola corrispondente al volume dei lisosomi (la colorazione assunta dai lisosomi è dovuta all'attività dell'enzima), rispetto alla sezione non colorata delle cellule, ovvero il citoplasma cellulare più i lisosomi. In tal modo si rende possibile il confronto delle ghiandole digestive prelevate dai mitili di controllo e da quelli trattati invece con il farmaco.

### **3.5 ACCUMULO DEI LIPIDI NEUTRI**

Questo tipo di valutazione si basa sulla colorazione selettiva ad opera di uno specifico colorante, Oil Red, e successiva analisi al microscopio. I chunks vengono posizionati all'interno del criostato (Microm, HM505 N) per poter ottenere delle fettine di 10  $\mu$ m di spessore. Queste trasferite su vetrino vengono fissate in una soluzione di Ca-formolo per 15 minuti a 4°C. Successivamente si lava con acqua distillata e poi i vetrini vengono posti in Trietilfosfato 60% per 3 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni, in seguito, si colorano con una soluzione di Oil Red all'1% per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. Infine, viene fissato il colorante in Trietilfosfato 60% per 30 secondi a temperatura ambiente. Effettuati dei risciacqui dei vetrini in acqua distillata, i vetrini si fissano con gel di glicerina. Vengono scattate 5 fotografie per ghiandola tramite Axiocam al microscopio, da sottoporre ad analisi d'immagine (con software "ScionImage 4.0") per determinare la superficie di ghiandola colorata, proporzionale alla quantità di lipidi neutri presenti all'interno dei lisosomi.

### **3.6 ACCUMULO DELLE LIPOFUSCINE**

Anche in questo caso è prevista la realizzazione di sezioni di ghiandola digestiva (utilizzando sempre il criostato Microm, HM505 N) da 10  $\mu$ m di spessore. Le fettine, disposte sui vetrini, vengono fissate con una soluzione di Ca-Formolo per 15 minuti. Si

immergono in una soluzione 3:1 di Cloruro di Ferro  $\text{FeCl}_3$  1% e Potassio Ferrocianuro  $\text{Fe}(\text{KCN})_6$  1% a temperatura ambiente per 5 minuti, al buio. In questo modo le lipofuscine si colorano di verde. In seguito, viene eliminata la soluzione, e si aggiunge acido acetico  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1% per 1 minuto. Dopo aver sciacquato i vetrini con acqua distillata, si devono far asciugare e fissare con gel di glicerina. Si procede successivamente all'analisi al microscopio ottico. Analogamente a quanto detto per il metodo precedente, sono state effettuate delle fotografie da sottoporre ad analisi d'immagine (con software "ScionImage 4.0") attraverso la quale, è stato possibile determinare la superficie colorata di ogni sezione di ghiandola, proporzionale alla quantità di lipofuscine presenti.

### **3.7 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA)**

Per la determinazione della malondialdeide, prodotto intermedio del processo di perossidazione dei lipidi, si parte aggiungendo alle ghiandole dei mitili 2 volumi di tampone Tris-HCl (20mM) contenente 0,1% di  $\beta$ -mercaptoetanololo. In questo caso è stato seguito il protocollo di Banni *et al.* (2007). Il tessuto è stato omogenato tramite un potter, e centrifugato a 9500 xg per 20 minuti a 4°C. Il surnatante è stato in parte prelevato e conservato in NaOH per il dosaggio delle proteine, e in parte conservato a -80°C. Ai campioni scongelati è stato poi aggiunto NMPI (N-methyl-2-phenylindole) sciolto in acetonitrile e metanolo (reattivo R1) e HCl 37% 10,1 N (reattivo R2) e sono stati posti a bagnomaria per 40 minuti a 45°C in lenta agitazione. Successivamente sono stati centrifugati a 15200 xg per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato trasferito nella micropiastra, che inserita in un lettore di micropiastre (Biotek EL 808), ha permesso di rilevare l'assorbanza letta a 570 nm. Per calcolare la concentrazione di MDA presente nei campioni, si deve costituire una curva di calibrazione di standard di TMOP (1,1,3,3,tetrametossipropano) e estrapolare l'equazione di una retta. Quindi si devono interpolare i dati delle assorbanze dei campioni con l'equazione della retta standard. Il risultato finale è stato espresso in nmol/mg\*proteine (Martin-Diaz *et al.*, 2009).

## **3.8 SAGGI ENZIMATICI**

### **3.8.1 Preparazione dei campioni per l'analisi dell'attività di Catalasi, GST e Acetilcolinesterasi**

Per le analisi di Catalasi e GST è stato seguito il protocollo di Mimeault *et al.* (2006) dove le ghiandole e le branchie sono stati omogeneizzati aggiungendo 5 volumi di tampone di omogeneizzazione KPB (Potassium Phosphate Buffer) 50 mM e 1  $\mu$ L di cocktail di inibitori delle proteasi ogni 100 mg totali di tessuto. L'omogenato si è ottenuto tramite un potter e centrifugato a 14.800 xg a 4°C per 15 minuti. Il sovranatante è stato in parte prelevato e diluito in NaOH per la determinazione delle proteine presenti nel tessuto ed in parte congelato in eppendorf a -80° C per la successiva determinazione delle attività degli enzimi.

Per la determinazione dell'attività dell'Acetilcolinesterasi, la preparazione dei campioni è differente da quella descritta precedentemente. Infatti l'omogeneizzazione delle branchie si è ottenuta impiegando 4 volumi di tampone PBS (Phosphate Buffered Saline) 10 mM. L'omogenato è stato centrifugato a 8.000 xg a 4°C per 30 minuti. È stato poi prelevato il sovrinatante, aliquotato e congelato a -80°C per il dosaggio di proteine e per la determinazione dell'attività enzimatica.

### **3.8.2 Determinazione dell'attività della Catalasi (CAT)**

L'attività dell'enzima CAT nelle ghiandole digestive e nelle branchie è stata determinata attraverso uno spettrofotometro (Beckman Coulter, DU 800 Spectrophotometer) valutando la diminuzione dell'assorbanza a 240 nm dovuta al consumo del perossido di idrogeno. La CAT catalizza la reazione di conversione di  $H_2O_2$  in  $H_2O$  e  $O_2$ . I campioni (30  $\mu$ L ciascuno) sono stati inseriti nelle cuvette di quarzo, nelle quali sono stati aggiunti  $H_2O_2$  (55mM) e tampone di omogeneizzazione KPB (50 mM) precedentemente preparato, arrivando così ad un volume finale di 3mL in ciascuna cuvetta. La reazione è stata seguita per due minuti e l'attività finale espressa in  $\mu$ mol/min\*mg proteine.



Fig.3.4. Spettrofotometro Beckman Coulter, DU 800 Spectrophotometer.

### 3.8.3 Determinazione dell'attività della glutatione s-transferasi (GST)

L'attività enzimatica della GST è stata determinata misurando l'incremento dell'assorbanza a 340 nm dovuto alla reazione di coniugazione del CDNB (1-Cl-2,4-dinitrobenzene) con il glutatione ridotto (GSH), utilizzando un lettore di micro piastre (Biotek EL 808). All'omogenato contenente l'enzima è stato aggiunto un substrato formato da 1-Cl-2,4-dinitrobenzene CDNB (0,8 M) e glutatione ridotto (GSH) (*Martin-Diaz et al., 2009*).



Fig.3.5. Lettore di micropiastre Biotek EL 808.

### 3.8.4 Determinazione dell'attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE)

L'attività enzimatica dall'AChE è stata valutata nelle branchie dei mitili seguendo il metodo di Ellman (*Ellman et al., 1961*) ottimizzato per i bivalvi, applicato ai campioni di branchie precedentemente preparati (paragrafo 3.8.1). L'attività dell'enzima è stata misurata secondo il principio che esso idrolizza il substrato acetiltiocolina producendo tiocolina che riduce uno specifico reattivo che aumenta la densità ottica della soluzione.

La lettura dell'assorbanza a 405 nm è stata eseguita utilizzando il lettore di micro piastre (Biotek EL 808) ed è stata effettuata dopo 10 minuti dall'attivazione dell'enzima con il substrato. Nel saggio è stata utilizzata una quantità di campione tale che nel volume finale fossero presenti 0,5 mg/mL di proteine precedentemente determinate con il metodo di Lowry *et al.* (1951). Ad ogni campione sono stati addizionati 50 µL di DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), o reagente di Ellman), è stato poi aggiunto il tampone PBS (Phosphate Buffered Saline) e l'acetiltiocolina. La tiocolina prodotta riduce il reattivo DTNB che libera nitrobenzoato fornendo una colorazione gialla. Una volta trascorsi i 10 minuti è stata effettuata una lettura, confrontata poi con un bianco che non contiene il substrato, e con una curva di standard di AChE.

### **3.9 DOSAGGIO DELLE PROTEINE**

La concentrazione delle proteine totali presenti nei campioni è stata valutata utilizzando il protocollo di Lowry *et al.*, 1951 che prevede la determinazione della quantità di proteine nei campioni usando una curva di calibrazione di standard di BSA (Albumina Bovina Serica). I campioni, già diluiti 1:5 in NaOH 1N, sono stati ulteriormente diluiti 1:1 con acqua distillata e caricati, insieme agli standard, nei pozzetti di una micropiastre alla quale successivamente sono stati aggiunti il reattivo A+B (Na/K tartrato 0,7 mM; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 187 mM ; NaOH 100 mM) e poi il reattivo C (soluzione 1:1 del Reattivo di Folin con acqua distillata), per poi essere letti nel lettore di micropiastre (Biotek EL 808). I risultati sono stati espressi in µg di proteine/µL di campione.

### **3.10 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software statistico SigmaStat 3.1. Sono state determinate differenze significative tra i campioni trattati e i controlli utilizzando l'ANOVA (Analisi della Varianza) ad una via, completate con il post-hoc test di Bonferroni. Le differenze tra i dati sono state considerate significative per valori di  $p < 0,05$  e altamente significative per  $p < 0,01$ .



# 4. RISULTATI

## 4.1 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY

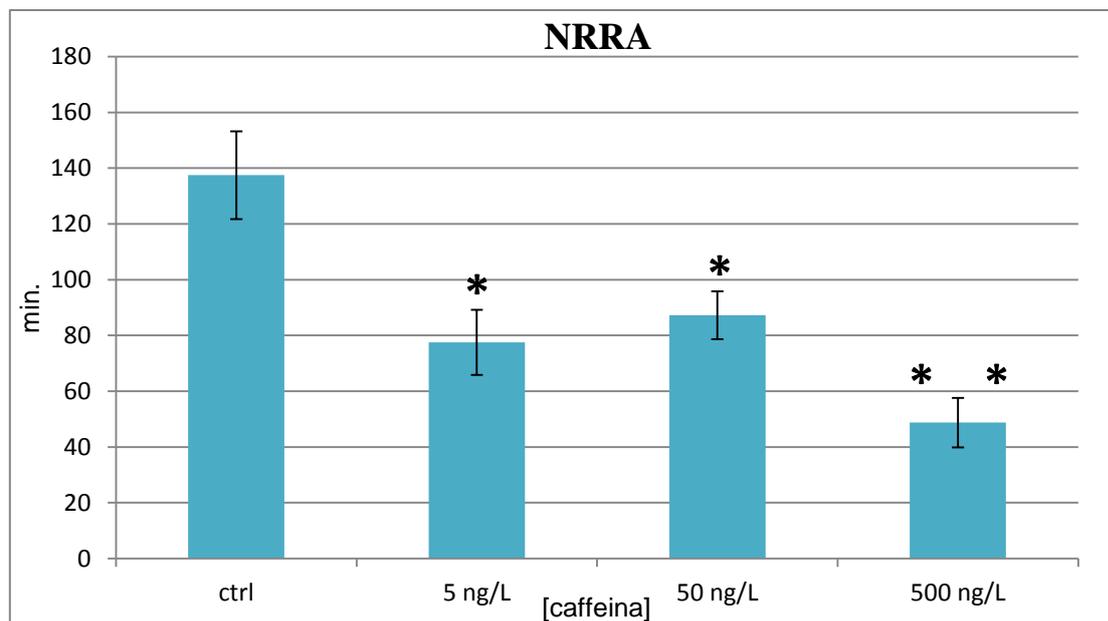
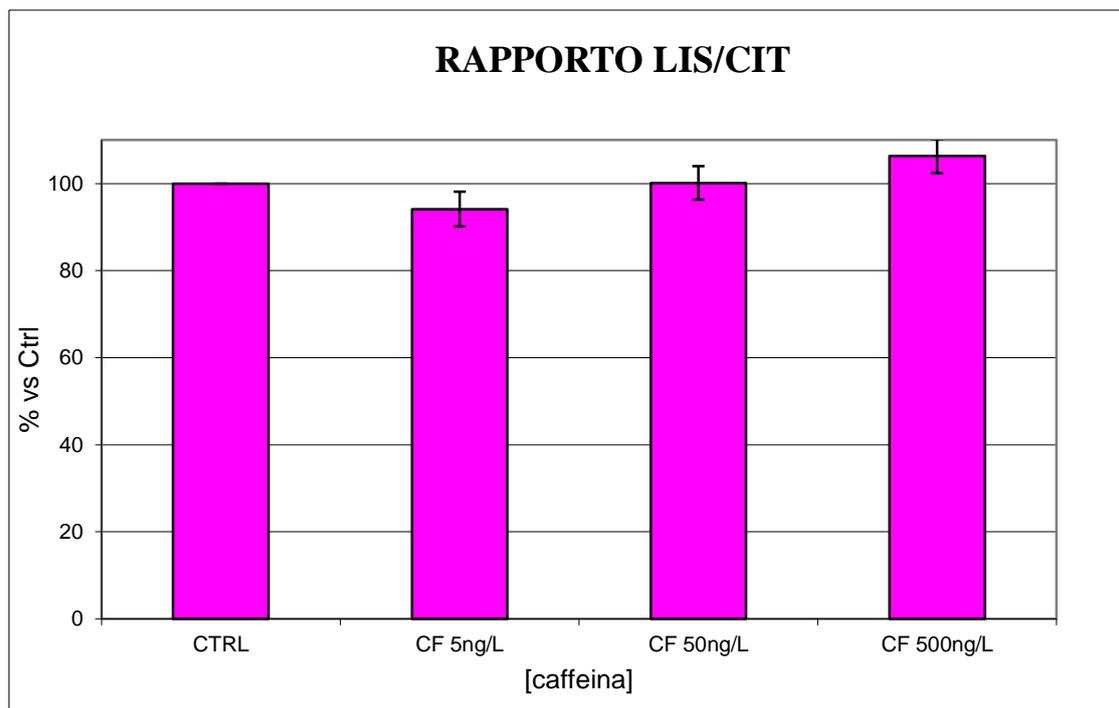


Fig.4.1. Stabilità delle membrane lisosomiali negli emociti dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. \*:p<0,05 rispetto al controllo; \*\*:p<0,01 rispetto al controllo. I risultati sono espressi in minuti. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES di 3 repliche sperimentali (N=3) ciascuna saggiata in quadruplicato.

L'effetto della caffeina sulla stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti dei molluschi, è illustrata nella Fig. 4.1. Il tempo di destabilizzazione della membrana lisosomiale è di 137,5 minuti negli emociti degli animali di controllo. Questi tempi sono propri di mitili in ottimo stato di salute. Alla concentrazione inferiore di caffeina (5 ng/L) si ha un valore di 77,5, in quella di 50 ng/L si ha un valore di 87,30 ed infine, il valore relativo alla concentrazione massima di esposizione, 500 ng/L è stato stimato essere di 48,75. L'analisi statistica (ANOVA) ha riscontrato una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) nei lisosomi dei mitili esposti alle concentrazioni di caffeina di 5 ng/L e 50 ng/L rispetto ai lisosomi dei mitili di controllo, e altamente significativa ( $p < 0,01$ ) nei lisosomi dei mitili esposti alla concentrazione massima di 500 ng/L rispetto ai lisosomi degli organismi di controllo.

## 4.2 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA



**Fig.4.2. Rapporto lisosomi/citoplasma nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES dei livelli misurati espressi come percentuale rispetto al controllo.**

I valori stimati dall'analisi del rapporto lisosomi/citoplasma nella Fig. 4.2 sono espressi in percentuale rispetto al controllo. Partendo dal valore di 100% del controllo si osserva una modesta diminuzione alla concentrazione inferiore di esposizione e valori leggermente crescenti nelle successive concentrazioni. L'ANOVA tuttavia non ha evidenziato delle differenze statisticamente significative nei mitili esposti a caffeina rispetto al controllo.

### 4.3 ACCUMULO DEI LIPIDI NEUTRI

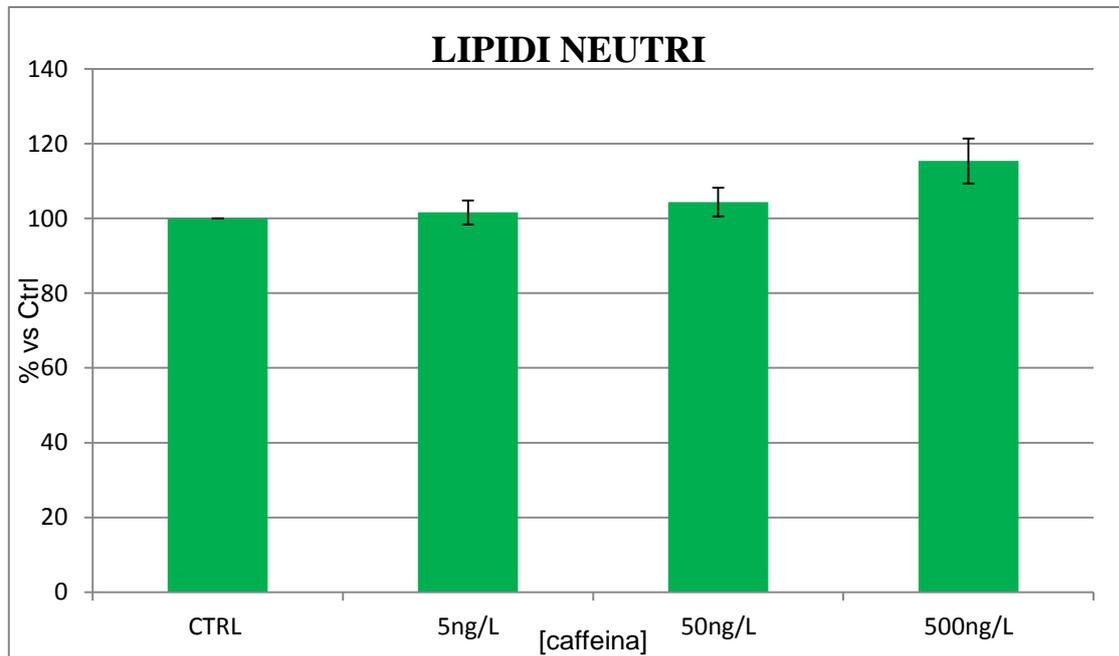


Fig.4.3. Accumulo dei lipidi neutri nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES dei livelli misurati espressi come percentuale rispetto al controllo.

I valori stimati dall'analisi dell'accumulo dei lipidi neutri mostrati nella Fig. 4.3 sono espressi in percentuale rispetto al controllo. La percentuale dei lipidi neutri dei mitili esposti per 7 giorni a caffeina alle tre concentrazioni (5 ng/L; 50 ng/L; 500 ng/L) non rileva differenze nei lisosomi dei mitili esposti rispetto al controllo.

#### 4.4 ACCUMULO DELLE LIPOFUSCINE

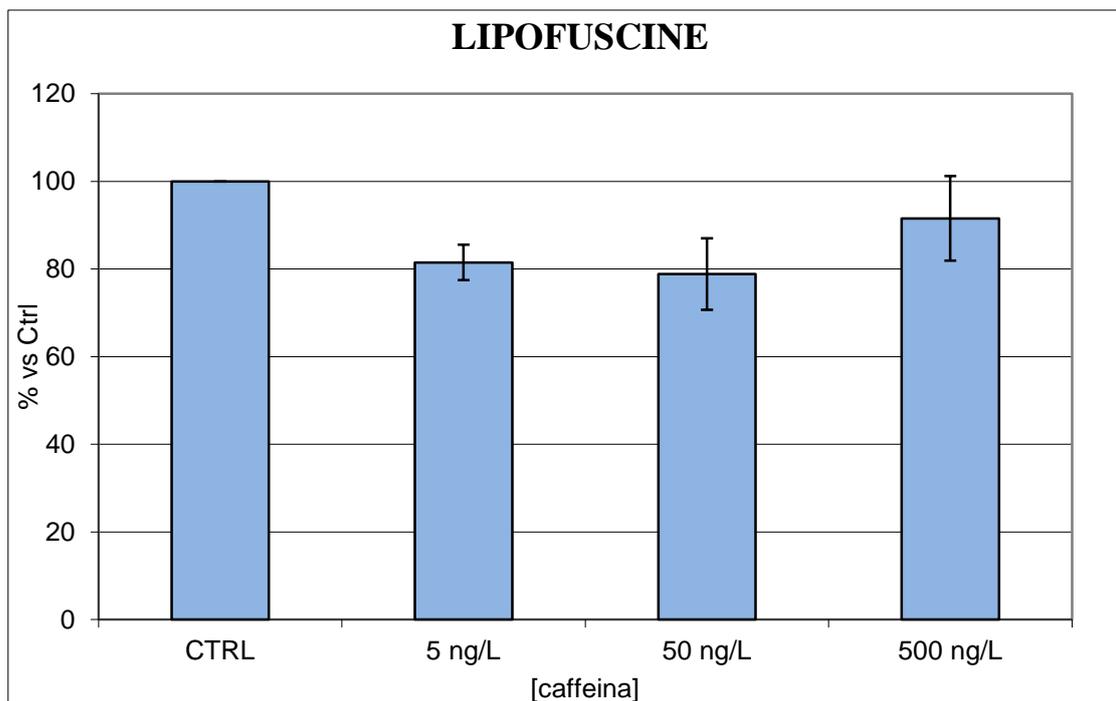
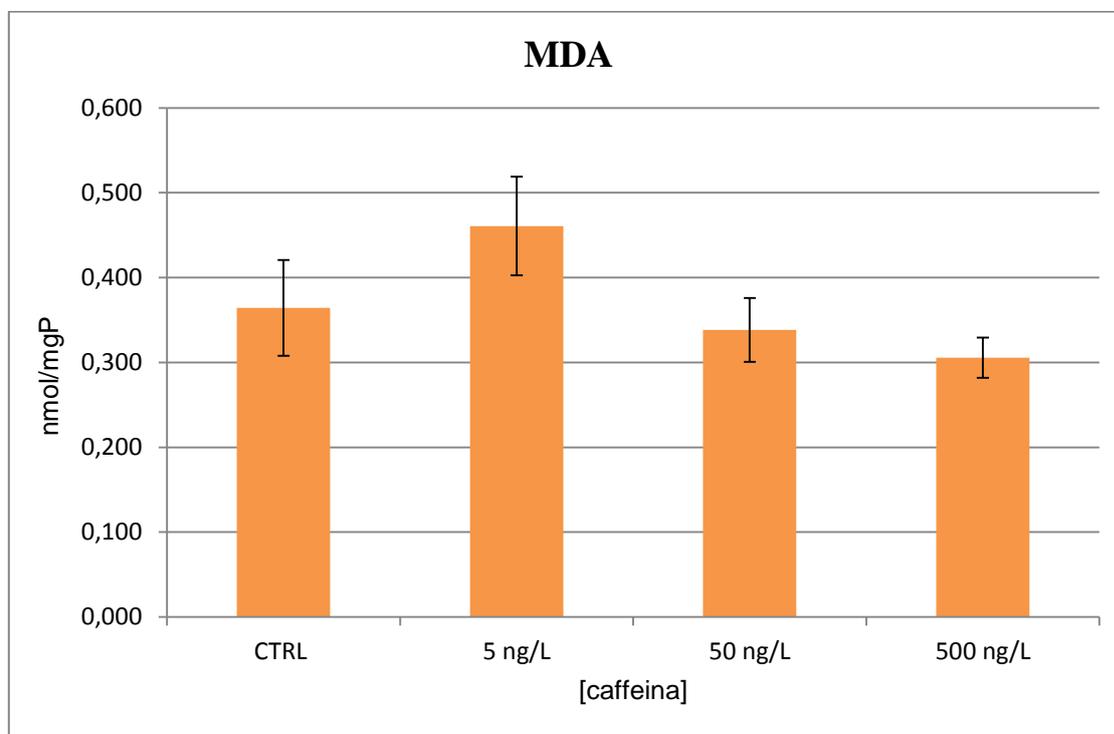


Fig.4.4. Accumulo di lipofuscine nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES dei livelli misurati espressi come percentuale rispetto al controllo.

I valori stimati dall'analisi dell'accumulo delle lipofuscine mostrati nella Fig. 4.4 sono espressi in percentuale rispetto al controllo. I valori di base riflettono l'estensione delle aree colorate con il reattivo di Schmorl corrispondenti alle lipofuscine, e sono espressi in unità arbitrarie. I valori relativi alle concentrazioni (5 ng/L: 81,50%; 50 ng/L: 78,85%; 500ng/L: 91,54%) mostrano una diminuzione lieve rispetto al controllo. Tuttavia, le differenze tra i valori dei mitili esposti e di controllo non sono statisticamente significative.

## 4.5 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA) IN GHIANDOLE DIGESTIVE

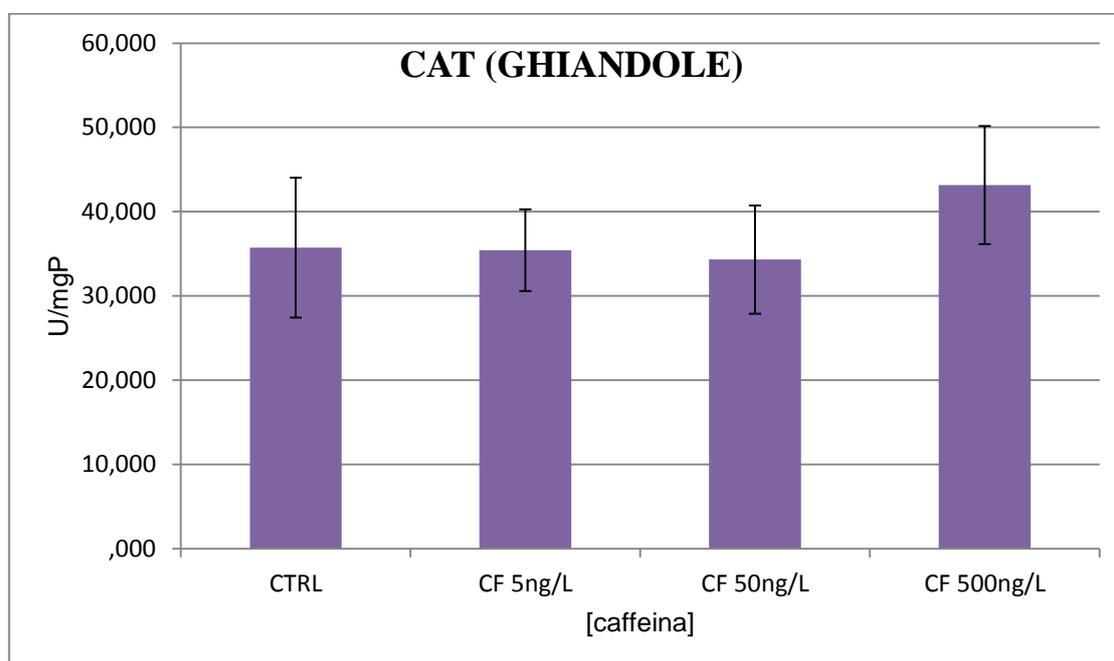


**Fig.4.5. Malondialdeide nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES di 3 repliche sperimentali (N=3) ciascuna saggiata in sestuplicato. I risultati sono espressi in nmol/mgP.**

La determinazione della malondialdeide nelle ghiandole digestive dei mitili esposti per 7 giorni alle tre concentrazioni di caffeina è illustrata nella Fig. 4.5. Si nota che solo il valore alla concentrazione 5 ng/L è superiore al controllo, mentre dalla concentrazione 50 ng/L si hanno valori inferiori. Il test ANOVA ha escluso la presenza di differenze significative tra i valori relativi ai mitili esposti a concentrazioni di caffeina e i mitili di controllo.

## 4.6 RISPOSTE ANTIOSSIDANTI E DETOSSIFICANTI

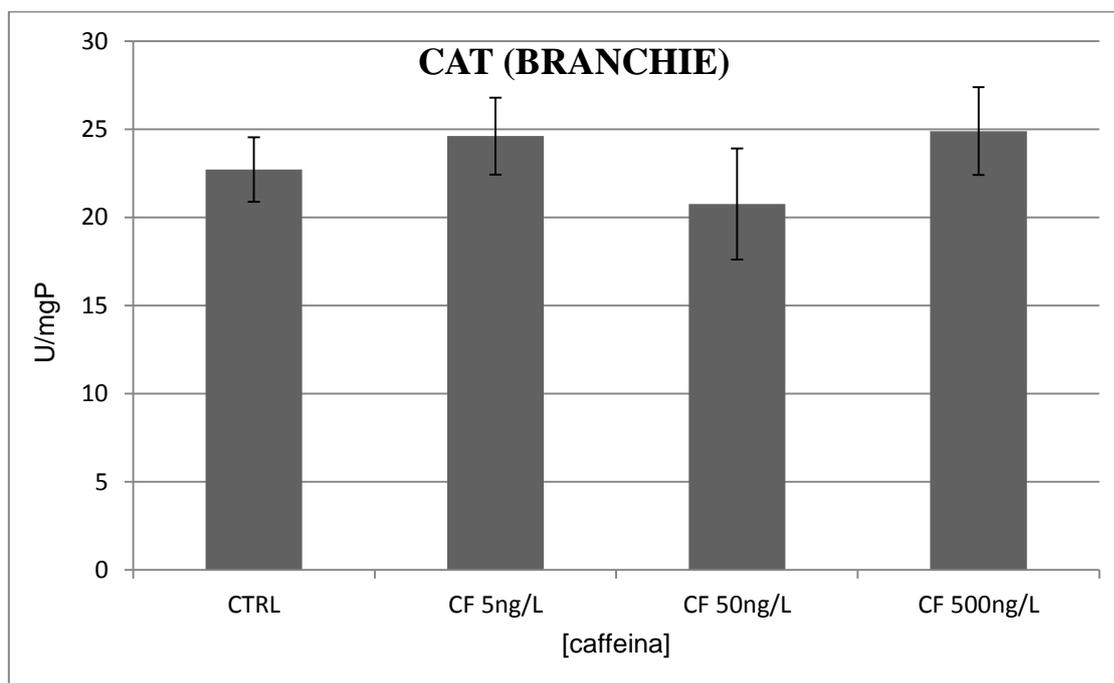
### 4.6.1 Determinazione dell'attività della catalasi nelle ghiandole digestive



**Fig.4.6.1** Attività della catalasi nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES di 3 repliche sperimentali (N=3) ciascuna saggiata in sestuplicato. I risultati sono espressi in U/mgP.

L'attività della catalasi nelle ghiandole digestive dei mitili esposti per 7 giorni a tre diverse concentrazioni di caffeina (5 ng/L; 50ng/L; 500 ng/L) è illustrata in Fig. 4.6.1. Non sono state riscontrate differenze nella determinazione dell'attività della catalasi nei vari trattamenti rispetto al controllo.

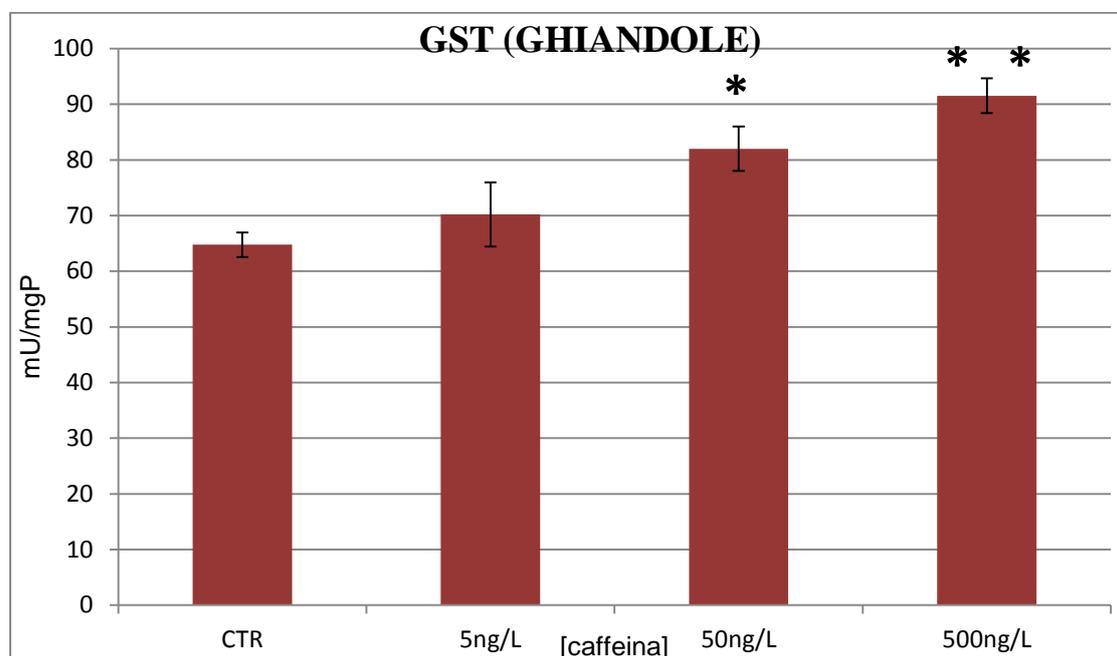
#### 4.6.2 Determinazione dell'attività della catalasi nelle branchie



**Fig.4.6.2** Attività della catalasi nelle branchie dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES di 3 repliche sperimentali (N=3) ciascuna saggiata in sestuplicato. I risultati sono espressi in U/mgP.

I valori dell'attività enzimatica della catalasi riscontrati nelle branchie sono espressi in U/mgP (Fig. 4.6.2). Nell'istogramma si nota che i valori relativi alle attività della catalasi nelle branchie dei mitili esposti al farmaco (5 ng/L: 24,61 U/mgP; 50ng/L: 20,76 U/mgP; 500ng/L: 24,89 U/mgP) variano leggermente rispetto al controllo. Dall'analisi statistica però non risultano differenze significative.

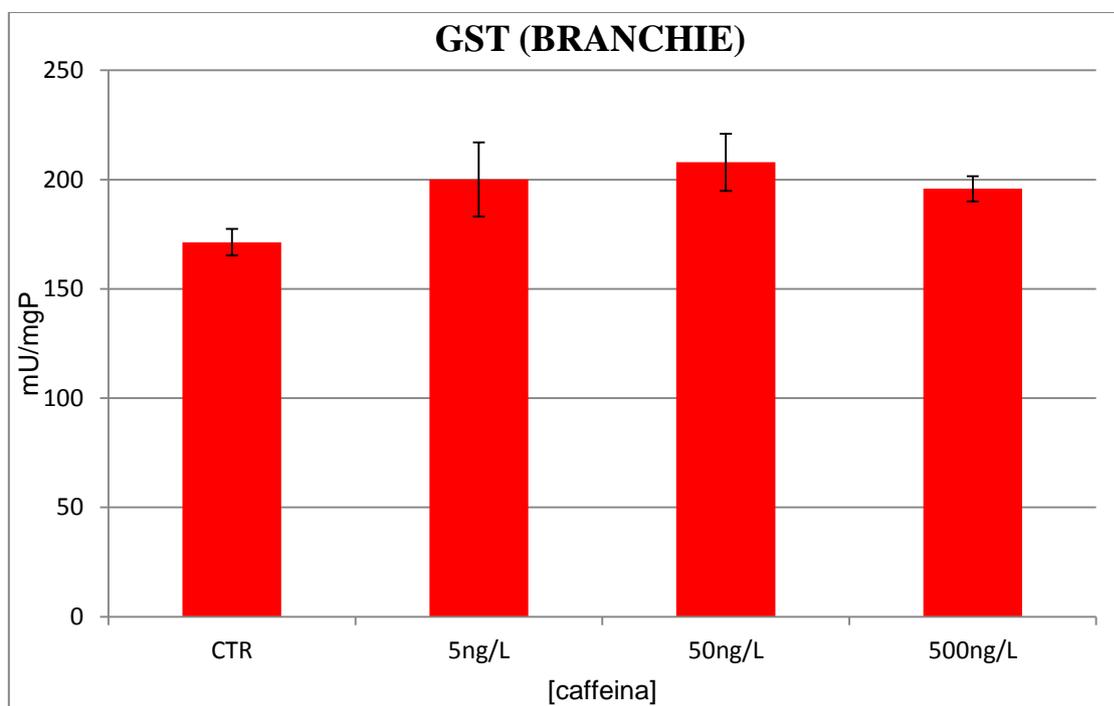
#### 4.6.3 Determinazione dell'attività della glutatione s-transferasi (GST) nelle ghiandole digestive



**Fig.4.6.3.** Attività della GST nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. \*:p<0,05 rispetto al controllo;\*\*p<0,001. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES di 3 repliche sperimentali (N=3) ciascuna saggiata in sestuplicato. I risultati sono espressi in mU/mgP.

I valori dell'attività enzimatica della GST riscontrati nelle ghiandole sono espressi in mU/mgP (Fig. 4.6.3). Dal grafico si notano dei valori crescenti relativi alle attività nei mitili esposti alla caffeina rispetto al controllo. Si può osservare una differenza significativa dell'attività della GST nelle ghiandole digestive dei mitili esposti alla concentrazione di 50 ng/L e altamente significativa alla concentrazione di 500 ng/L.

#### 4.6.4 Determinazione dell'attività della glutatione s-transferasi (GST) nelle branchie

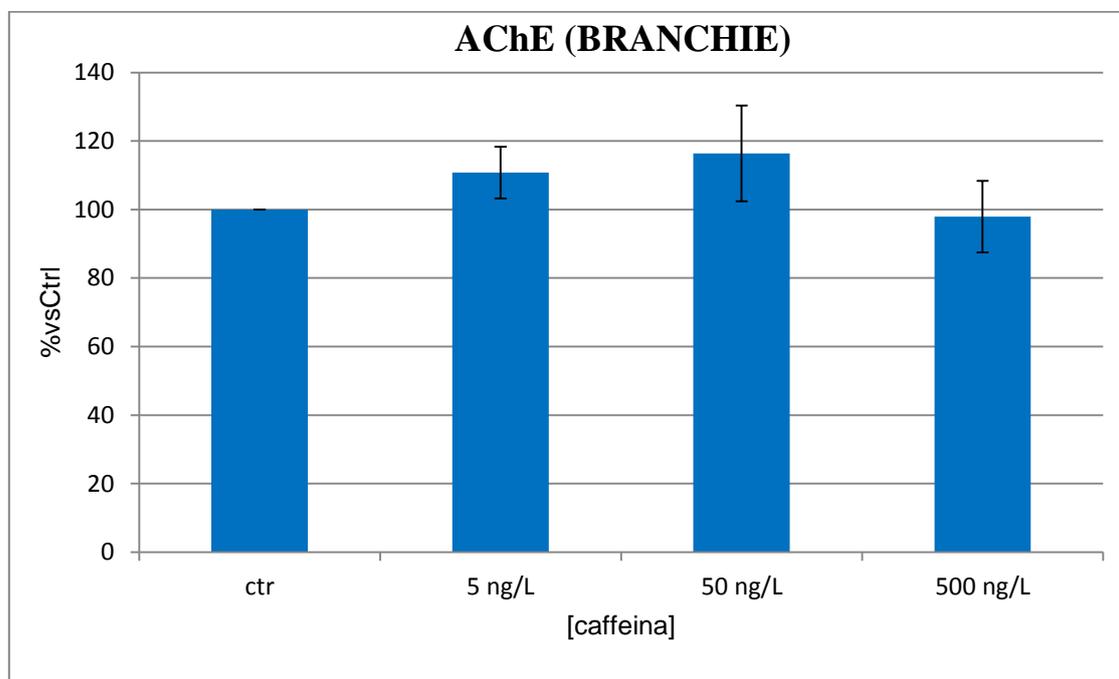


**Fig.4.6.4.** Attività della GST nelle branchie dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES di 3 repliche sperimentali (N=3) ciascuna saggiata in sestuplicato. I risultati sono espressi in mU/mgP.

I valori dell'attività enzimatica della GST riscontrati nelle branchie sono espressi in mU/mgP (Fig. 4.6.4). Dal grafico si nota un andamento crescente delle attività enzimatiche relative al controllo e alle concentrazioni 5 ng/L e 50 ng/L. L'analisi statistica non ha messo in evidenza differenze significative.

## 4.7 ATTIVITA' DELL'ENZIMA ACETILCOLINESTERASI

### Determinazione dell'attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE) sulle branchie



**Fig.4.7.** Attività della AChE nelle branchie dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES di 3 repliche sperimentali (N=3) ciascuna saggiata in sestuplicato. I risultati sono espressi in % rispetto al controllo (l'attività enzimatica del controllo è pari a  $7,52 \pm 0,88$  nmol/min\*mg di proteina).

I valori dell'attività enzimatica della AChE riscontrati nelle branchie sono espressi in % rispetto al controllo (Fig. 4.7). L'analisi statistica indica come non significative le differenze tra i valori relativi alle concentrazioni di caffeina e il controllo.



# **5.DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Negli ultimi anni è stato evidenziato che diversi farmaci presenti in ambiente, già a bassissime concentrazioni, influiscono sul metabolismo di pesci e molluschi, nonché sull'attività riproduttiva. Da qui si è sviluppata l'esigenza di studiare l'interazione dei farmaci o loro residui con gli organismi acquatici a concentrazioni rilevate nell'ambiente marino, e valutare il meccanismo d'azione che genera risposte metaboliche a dosaggi bassissimi, grazie alle conoscenze che si hanno relativamente ai farmaci commercializzati. I farmaci sono progettati per avere target specifici nelle vie metaboliche e molecolari, nell'uomo e negli animali, ma spesso determinano importanti effetti collaterali. Una volta introdotti nell'ambiente essi possono agire sulle stesse vie in animali aventi identici o simili organi bersaglio, tessuti, cellule o biomolecole. Alcuni recettori presenti negli animali inferiori sono simili a quelli umani, altri invece, sono diversi o assenti, il che significa che si possono verificare differenti modalità d'azione negli animali inferiori: nel caso in cui gli organismi acquatici conservino dal punto di vista evolutivo gli stessi bersagli molecolari presenti negli organismi target, l'esposizione a concentrazioni di residui farmaceutici nell'ordine dei ng/L potrebbe produrre alterazioni fisiologiche specifiche, o generare effetti aspecifici in funzione del ruolo svolto da tali bersagli nelle specie non target (*Schmitt et al., 2009; Christen et al., 2010*). Gli organismi acquatici sono obiettivi particolarmente importanti, in quanto sono esposti ai residui delle acque potenzialmente contenenti farmaci per tutta la loro vita.

Come descritto nei capitoli precedenti, il seguente lavoro di tesi si è basato sull'esposizione di organismi, definiti 'sentinella', alla caffeina, molecola dall'effetto stimolante, comune sostanza psicoattiva tra le più diffuse e consumate al mondo in quanto utilizzata a scopo ricreativo e in ambito medico (*Fent et al., 2006; Palo e Choudhury, 2006*). Tra i vari farmaci ampiamente diffusi in ambiente, è stato scelto di studiare la caffeina perché il laboratorio si è concentrato in questi anni sui farmaci ambientali che svolgono il loro effetto terapeutico del tutto o in parte variando le concentrazioni intracellulari di AMPc (*Martin-Diaz et al., 2009; Franzellitti et al., 2011*). I possibili effetti della caffeina sono stati valutati dopo esposizione dei mitili, *Mytilus galloprovincialis*, per 7 giorni a concentrazioni pari a 5, 50 e 500 ng/L, vale a dire un range che va dalle concentrazioni ambientali a quelle rinvenute nelle acque reflue. In letteratura uno studio ha citato gli effetti inibitori della caffeina sulla glicogeno fosforilasi, nei mitili *Mytilus galloprovincialis*, tuttavia non sono presenti altri studi in proposito. Sono però stati realizzati dei lavori in altri organismi marini quali granchi e vongole (*Anguirre-Martinez et al., 2013*): in particolare questi autori hanno osservato che

la stabilità della membrana lisosomiale, valutata nell'emolinfa di questi organismi, mostra una forte relazione dose-dipendente con le concentrazioni di caffeina a cui sono esposti. Tali studi hanno rivelato non solo che la caffeina disciolta in acqua alle concentrazioni testate (che includono le concentrazioni ambientali) provoca una riduzione dello stato di salute dei granchi e delle vongole, ma anche che l'esposizione a questa sostanza attiva enzimi di biotrasformazione, altera lo stato di ossidazione delle cellule, provoca stress ossidativo, ed è associata con il danno al DNA.

Le analisi da me effettuate durante il lavoro di tesi hanno riguardato un'ampia batteria di biomarker attraverso i quali si è valutato lo stato di salute dei mitili. I biomarker sono alterazioni fisiologiche, biochimiche o istologiche la cui variazione è ben correlata alla presenza di contaminanti ambientali; il loro utilizzo è suggerito da esperti del Joint Research Centre (JRC, 2010) per la valutazione del Good Environmental Status nell'ambiente marino richiesto dalla Marine Strategy Framework Directive (MSFD, 2008). Attraverso il Neutral Red Retention Assay (NRRA) si nota che i tempi di destabilizzazione delle membrane lisosomiali degli emociti diminuiscono nei mitili esposti a caffeina (Fig. 4.1). I tempi bassi di ritenzione del colorante all'interno dei lisosomi sono associati ai tempi di destabilizzazione delle membrane lisosomiali e indicano condizioni di stress, soprattutto di tipo ossidativo (*Viarengo et al., 2007*). Molti xenobiotici o loro metaboliti possono provocare, appunto, stress ossidativo attraverso il quale si intende il verificarsi di effetti dovuti alla tossicità dell'ossigeno, in particolare, delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) (*Regoli e Giuliani, 2014*). Nelle reazioni del metabolismo aerobico l'utilizzo dell'ossigeno molecolare ( $O_2$ ) comporta la produzione di piccole quantità del radicale anione superossido ( $O_2^-$ ), del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), e del radicale idrossile ( $HO^\cdot$ ), potenti ossidanti capaci di reagire con macromolecole cellulari causando inattivazione di enzimi, perossidazione lipidica, danni al DNA, fino alla morte cellulare (*Regoli e Giuliani, 2014*). La formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), se non contrastata da meccanismi di difesa cellulare, è seguita dal loro ingresso all'interno dei lisosomi nei quali provocano danni a livello della membrana. Ecco perché la stabilità delle membrane lisosomiali è considerata un ottimo indicatore degli effetti dovuti all'esposizione di organismi ad agenti tossici. Peraltro la diminuzione dell'integrità delle membrane lisosomiali è direttamente correlata con la tossicità subita dalla cellula, il potenziale di sintesi proteica e l'investimento nella crescita di mitili e pesci (*Moore et al., 2004*).

Inoltre la diminuzione della stabilità della membrana lisosomiale è correlata con un significativo incremento di autofagia e questo può determinare una grande perdita di citoplasma. Nelle cellule delle ghiandole digestive nei mitili esposti a caffeina, si può osservare un lieve aumento della percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma rispetto al controllo (Fig. 4.2) alle concentrazioni di 50-500 ng/L, cosa che invece non si riscontra per la concentrazione di esposizione più bassa. I lisosomi, in condizioni di stress, tendono ad aumentare le proprie dimensioni fondendosi tra loro e inglobando molecole come lipofuscine e lipidi neutri (prodotti in condizioni di stress, indotto dall'esposizione di un organismo a sostanze tossiche, e fagocitati in seguito all'attivazione di un meccanismo di difesa cellulare), facendo aumentare in questo modo il valore del rapporto tra lisosomi e citoplasma (*Moore et al., 2007; Moore et al., 2008*). Tuttavia l'ANOVA non ha evidenziato delle differenze statisticamente significative nei mitili esposti a caffeina rispetto al controllo. Anche nel caso delle lipofuscine le differenze tra i campioni trattati rispetto al controllo non sono significative dal punto di vista statistico. Le lipofuscine sono aggregati di lipoproteine, metalli e sostanze tossiche prodotti nelle cellule esposte a contaminanti e in generale a stress ossidativo (*Viarengo, 1989*); a seguito degli stessi fattori di stress la cellula accumula anche i lipidi neutri. La percentuale di accumulo dei lipidi neutri aumenta di poco nei mitili esposti alle tre concentrazioni di caffeina; la statistica non rivela però differenze significative.

Per poter valutare in maniera adeguata lo stress ossidativo dei mitili esposti alla caffeina è stato utilizzato un altro biomarker, l'accumulo di malondialdeide (MDA). Quest'ultima è un composto che si forma come prodotto intermedio nei processi di perossidazione lipidica. Considerando i risultati ottenuti (Fig. 4.5), dal diagramma si nota un lieve aumento della concentrazione di malondialdeide nelle ghiandole digestive dei mitili esposti alla concentrazione di caffeina di 5 ng/L. Un tale trend potrebbe far presumere che ci sia stato, alla concentrazione minore, un aumento di MDA dovuto a condizioni di stress e poi, con l'aumentare delle concentrazioni, lo stress sia aumentato provocando la trasformazione della malondialdeide nei prodotti finali della perossidazione lipidica (lipofuscine e lipidi neutri). Anche in questo caso però l'analisi statistica ha escluso la presenza di differenze significative tra i valori relativi ai mitili esposti a concentrazioni di caffeina e i mitili di controllo.

Altre analisi condotte in questo lavoro di tesi, hanno riguardato la valutazione delle attività enzimatiche, nelle ghiandole digestive e nelle branchie, degli enzimi CAT (catalasi), GST (glutazione S-transferasi) e AChE (acetilcolinesterasi). Come

precedentemente detto gli organismi possiedono enzimi antiossidanti, indispensabili nella difesa delle cellule dagli attacchi da parte dei ROS. La catalasi è un enzima presente nei perossisomi coinvolto nei processi di detossificazione cellulare, la quale catalizza la conversione del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) ad acqua ( $H_2O$ ) e ossigeno ( $O_2$ ). Osservando i risultati relativi all'attività della catalasi nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a caffeina (Fig. 4.6.1), si nota un aumento dell'attività, rispetto al controllo, solo alla concentrazione 500 ng/L che però non raggiunge la significatività. Analogamente stimando l'attività enzimatica nelle branchie dove, come noto nei mitili, si hanno valori di attività inferiori rispetto a quelli relativi alle ghiandole, non sono emerse differenze significative rispetto al controllo (Fig. 4.6.2).

È stata valutata l'attività della GST nelle ghiandole e nelle branchie dei mitili esposti. La GST è un enzima che prende parte alla fase II del metabolismo degli xenobiotici catalizzando le reazioni di coniugazione degli xenobiotici con il glutatione ridotto, GSH. Per quanto riguarda le ghiandole digestive, si osserva una differenza significativa rispetto al controllo (Fig. 4.6.3). La ghiandola digestiva è il tessuto maggiormente coinvolto nel processo di detossificazione da xenobiotici e l'aumento dell'attività della GST nei mitili esposti a caffeina indica che è stata attivata una difesa detossificante. L'attività nelle branchie non ha evidenziato differenze significative, nonostante i valori siano leggermente superiori rispetto al controllo (Fig. 4.6.4).

Il terzo ed ultimo saggio enzimatico ha riguardato la determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE), un enzima che catalizza l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina con produzione di colina e acetato. Il saggio è stato svolto nelle branchie ottenendo i risultati visualizzati in Fig. 4.7.

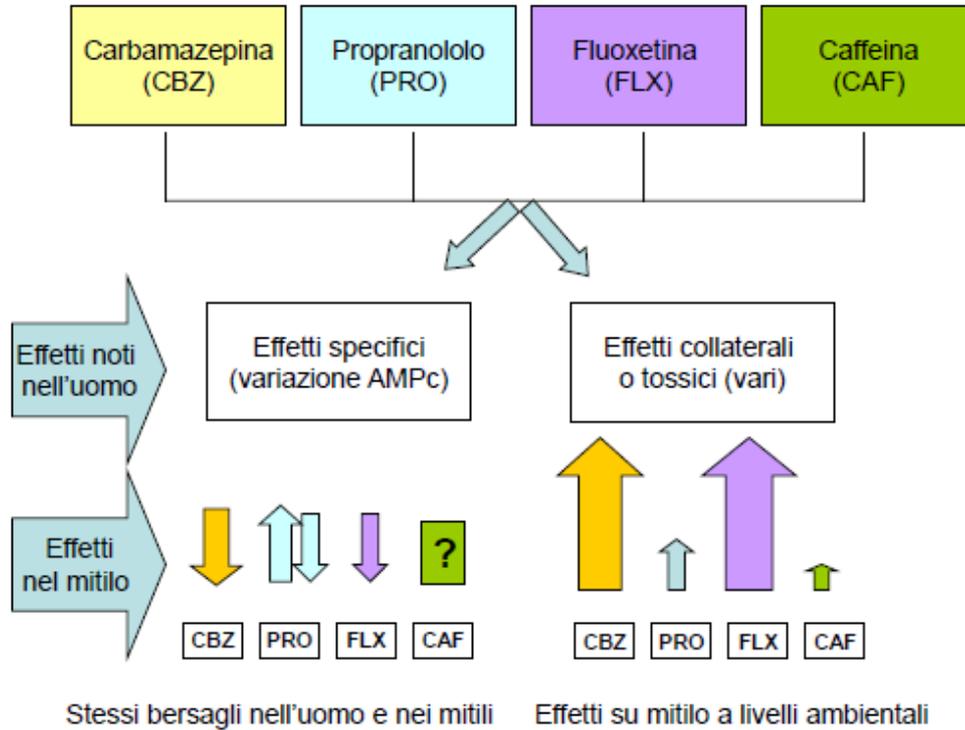
Data la bassa attività dell'enzima nella ghiandola digestiva, non sembra che questo tessuto sia adatto per valutare la riduzione dell'attività dell'AChE come biomarker di neurotossicità, ecco perché abbiamo deciso di non verificarlo in questo lavoro di tesi, e soprattutto dopo aver analizzato i risultati relativi alle branchie. Questi ultimi infatti, alle prime due concentrazioni risultano essere maggiori al valore dell'attività nei mitili di controllo seppure non significative.

In concomitanza con il lavoro da me svolto, nel laboratorio è stato valutato se la caffeina potesse rappresentare un fattore di stress proteotossico, e in conseguenza di questo, potesse indurre la cosiddetta "risposta HSP". In questo caso la caffeina non ha indotto alcun aumento significativo della risposta HSP70. Questo suggerisce che la caffeina stessa, alle concentrazioni ambientali, non rappresenta un fattore che possa influenzare la

struttura terziaria delle proteine cellulari. Rispetto ad altri farmaci, appare quindi un contaminante ambientale che non disturba il proteoma cellulare.

Quindi, oltre ai contaminati ad alta persistenza nelle acque, nuove sostanze destano sempre maggiore preoccupazione per i possibili effetti ambientali e sanitari. Tra queste, farmaci e ormoni, micotossine e fitofarmaci derivati dall'incremento dei consumi e dal raggiungimento di un maggiore benessere economico. La comunità scientifica è concorde nel ritenere che, sebbene queste sostanze si presentino in concentrazioni apparentemente trascurabili, non si possano escludere delle conseguenze per l'uomo e per l'ecosistema. La maggior parte degli studi pubblicati negli ultimi anni si è focalizzata sui contaminanti emergenti presenti nelle acque, molecole ad alta persistenza, alcune molto note, altre invece più trascurate. Proprio ispirandoci a questa crescente consapevolezza che nulla si debba trascurare, abbiamo elaborato questo lavoro di tesi, esponendo i mitili a diverse concentrazioni di caffeina.

Gli strumenti classici applicati nella valutazione della qualità ambientale sono i bioassays e i parametri ecologici, che tuttavia non sono in grado di identificare gli effetti precoci della risposta allo stress alla base di successivi effetti che possono culminare con la morte. Gli studi sulla fase precoce dell'alterazione utilizzano batterie di biomarker subletali valutati in organismi sentinella. Nel presente lavoro li abbiamo applicati ad uno studio in ambiente controllato, esponendo i mitili alla caffeina. Una esposizione di 7 giorni ha prodotto alterazioni della stabilità della membrana lisosomiale negli emociti, e l'instaurarsi di processi di detossificazione nella ghiandola digestiva, evidenziati dalla GST. Gli altri biomarker invece non mettono in evidenza che la caffeina, alle concentrazioni ambientali, possa indurre alterazioni come accade invece relativamente ad altri farmaci. Infatti l'esposizione per 7 giorni dei mitili a concentrazioni ambientali di farmaci quali la carbamazepina, il propranololo e la fluoxetina ha indotto alterazioni molto significative dello stato fisiologico degli organismi, indicate chiaramente dai biomarker (Fig. 5.1).



**Fig.5.1. Rappresentazione di alterazioni significative dello stato fisiologico dei mitili esposti a differenti farmaci.**

Nella Fig. 5.1 è evidenziato che i farmaci nell'uomo hanno effetti terapeutici specifici (nel caso particolare tutti i farmaci hanno effetto sulla traduzione del segnale mediata dall'AMPc) ottenuti per interazione con altrettanto specifici bersagli molecolari. Se questi bersagli sono presenti anche nei mitili, si attende la stessa risposta. La figura evidenzia che carbamazepina e fluoxetina causano riduzione dei livelli di AMPc anche nel mitilo. Il propranololo determina aumento di AMPc nel mantello/gonadi e diminuzione nella ghiandola digestiva, interagendo con recettori differenti. Lo studio degli effetti specifici della caffeina sul mitilo sono attualmente in corso. Inoltre i farmaci, di solito a dosi elevate o se utilizzati per lungo tempo, causano nell'uomo effetti collaterali spesso tossici. Come illustrato nella parte bassa a destra della figura, i farmaci testati a concentrazioni ambientali producono effetti avversi sulla fisiologia dei mitili in misura differente. Carbamazepina e fluoxetina sono altamente tossici, il propranololo lo è moderatamente, mentre la caffeina ha effetti modesti. L'effetto avverso è riconducibile alla riduzione della stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti. Questo indica un probabile effetto ossidativo su queste cellule, che tuttavia sono le prime forme di difesa dell'organismo contro agenti esterni. L'effetto sulla GST rappresenta invece la risposta detossificante dell'animale volta alla escrezione del farmaco.

In conclusione, la caffeina, sostanza largamente usata a livello globale sia a scopo ricreativo che in ambito medico, e riversata nell'ambiente marino in maniera costante, alle concentrazioni ambientali mostra un ordine di potenza sicuramente inferiore rispetto agli altri farmaci testati nelle stesse condizioni sperimentali, dove la potenza di un farmaco è definita come *"la dose necessaria per produrre una risposta farmacologica il cui valore sia il 50% di quella massima producibile"*. In questo quadro generale i dati ottenuti sui mitili suggeriscono che la caffeina, anche nel range di concentrazioni ambientali più elevato, possa essere considerata un farmaco che desta bassa preoccupazione. Ciò non esclude che la caffeina possa avere effetti sinergici o addittivi con altri farmaci presenti in ambiente. Gli effetti delle miscele sono tuttora assai poco note. Anche se si attende che sia modesto, è inoltre auspicabile che sia studiato il potenziale di bioaccumulo, significativo per eventuali effetti a lungo termine.

# **6. BIBLIOGRAFIA**

- Aguirre-Martinez GV, Buratti S, Fabbri E, Del Valls TA, Martín-Díaz ML. 2013. Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. *J Environ Sci*, 25: 1408-1418.
- Aguirre-Martínez GV, Del Valls TA, Martín-Díaz ML. 2013. Identification of biomarkers responsive to chronic exposure to pharmaceuticals in target tissues of *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res*, 87-88: 1-11.
- Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50: 1319-1330.
- Arnaud MJ. 1987. The pharmacology of caffeine. *Progress in drug research*, 31: 273-313.
- Arnaud MJ. 1993. in: Garattini, S. (ed.): Caffeine, Coffee and Health, Raven Press, New York 43-95.
- Ashton D, Hilton M, Thomas KV. 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci Total Environ*, 333: 167-184.
- Bartels P, Tumpling W Jr. 2007. Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters. *Sci Total Environ*, 374: 143-155.
- Beaudoin MS, Graham TE. 2011. Methylxanthines and human health: epidemiological and experimental evidence. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 200: 509-48.
- Bendz D, Paxeus NA, Ginn TR, Loge FJ. 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje river in Sweden. *J Hazard Mat*, 122: 195-204.
- Benotti MJ, Brownawell BJ. 2007. Distributions of Pharmaceuticals in an Urban Estuary during both Dry and Wet-Weather Conditions. *Environ Sci Technol*, 41: 5795-5802.
- Benowitz NL. 1990. Clinical pharmacology of caffeine. *Ann Rev Med*, 41: 277-288.
- Bonomo L. 2008. Trattamenti delle acque reflue. *McGraw Hill. ISBN*, 88: 6518-4.
- Boreen AL, Arnold WA, McNeill K. 2003. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Aquat Sci*, 65:320-341.
- Borgmann U, Bennie DT, Ball AL, Palabrica V. 2007. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. *Chemosphere*, 66: 1278-1283.
- Boxall AB, Kolpin DW, Halling-Sorensen B, Tolls J. 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ Sci Technol*, 37 (15): 286A-294A.
- Boyd GR, Reemtsma H, Grimm DA, Mitra S. 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCP) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci Tot Environ*, 311: 135-149.

- Bradley PM, Barber LB, Kolpin DW, McMahon PB, Chapelle FH. 2007. Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: implications for use as wastewater indicators. *Environ Toxicol Chem*, 26: 1116-1121.
- Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, Lewis RJ. 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ Toxicol Chem*, 24: 464-469.
- Brun GL, Bernier M, Losier R, Doe K, Jackman P, Lee HB. 2006. Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ Toxicol Chem*, 25: 2163-2176.
- Buerge IJ, Poiger T, Müller MD, Buser HR. 2003. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ Sci Technol*, 37: 691-700.
- Buerge IJ, Poigner T, Müller MD, Buser HR. 2006. Combined sewer overflow to surface waters detected by the anthropogenic marker caffeine. *Environ Sci Technol*, 40: 4096-4102.
- Buser HR, Poiger T, Müller MD. 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ Sci Technol*, 32: 3449-3456.
- Caliman FA, Gavirilescu M. 2009. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment. A review. *Clean*, 37: 277-303.
- Calza F. 2008. L'acqua. Utilizzo, depurazione, recupero. 3<sup>a</sup> ed., *Tecniche Nuove*. ISBN, 88: 1540-3.
- Cano-Marquina A, Tarín JJ, Cano A. 2013. The impact of coffee on health. *Maturitas*, 75: 7-21.
- Carballa M, Omil F, Lema JM, Llombart M, Garcia-Jares I, Rodriguez C, Gomez M, Ternes T. 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res*, 38: 2918-2926.
- Christen V, Hickmann S, Rechenberg B, Fent K. 2010. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. *Aquat Toxicol*, 96: 167-181.
- Christen V, Zucchi S, Fent K. 2011. Effects of the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. *Aquat Toxicol*, 102:167-176.
- Christensen AM, Markussen B, Baun A, Halling-Sorensen B. 2009. Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. *Chemosphere*, 77: 351-358.

- Cirelli GL. 2003. I trattamenti naturali delle acque reflue urbane. Sistemi Editoriali-Esselibri. ISBN, 88: 513-517.
- Clara M, Strenn B, Gans O, Martinez E, Kreuzinger N, Kroiss H. 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res*, 39: 4797-4807.
- Clarke BO, Smith SR. 2011. Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ Int*, 37: 226-24.
- Cleuvers M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett*, 142: 185-194.
- Cleuvers M. 2004. Mixture toxicity of anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Saf*, 59: 309-315.
- Comeau F, Surette C, Brun GL, Losier R. 2008. The Occurrence of Acidic Drugs and Caffeine in Sewage Effluents and Receiving Waters from Three Coastal Watersheds in Atlantic Canada. *Sci Tot Environ*, 396: 132-146.
- Contardi C, Gay M, Ghisotti A, Robasto G, Tabasso G. 1991. Guida tecnica sui trattamenti delle acque. Tecniche di trattamento dei reflui, sistemi di depurazione e di smaltimento. 2<sup>a</sup> ed., Edizioni Franco Angeli. ISBN, 88: 6582-5.
- Corcoran J, Winter MJ, and Tyler CR. 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit Rev Toxicol*, 40(4): 287-304.
- Curatolo PW, Robertson D. 1983. The health consequences of caffeine. *Ann Int Med* , 98: 641-653.
- Daneshvar A, Aboulfadl K, Viglino L, Broséus R, Sauvé S, Madoux-Humery AS, Weyhenmeyer Gesa A, Prévost M. 2012. Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region. *Chemosphere*, 88: 131-139.
- Daughton CG, Ternes TA. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environ Health Perspect*, 107: 907-938.
- Daughton CG. I 2003. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environ Health Perspect*, 11: 757-774.
- Daughton CG. II 2003. Cradle-to-Cradle Stewardship of Drugs for Minimizing Their Environmental Disposition While Promoting Human Health. II. Drug Disposal, Waste Reduction, and Future Directions. *Environ Health Perspect*, 11: 775-785.

- Daughton CG. 2007. "Pharmaceuticals in the Environment: Sources and Their Management," Chapter 1, 1-58, In *Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle* (M. Petrovic and D. Barcelo, Eds.), *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry series* (D. Barcelo, Ed.), Volume 50, *Elsevier Science*, 564.
- Daughton CG, Brooks BW. 2011. Active Pharmaceutical Ingredients and Aquatic Organisms. *Environmental Contaminants in biota: Interpreting Tissue Concentrations*, 2<sup>nd</sup> ed.: 287-347.
- Daval JL, Werck MC, Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. 1991. Quantitative autoradiographic study of the postnatal development of adenosine A1 receptors and their coupling to G proteins in the rat brain. *Neurosci*, 40: 841-851.
- Deblondea T, Cossu-Leguille C, Hartemann P. 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *Int J Hygiene Environ Health*, 214: 442-448.
- DeLorenzo ME, Fleming J. 2008. Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 54: 203-210.
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemical in STW effluent. *Environ Sci Technol*, 32: 1549-1560.
- Díaz-Cruz MS, Barceló D. 2008. Trace organic chemicals contamination in ground water recharge. *Chemosphere*, 72: 333-342.
- Díaz-Cruz MS, Garcia-Galan MJ, Guerra P, Jelic A, Postigo C, Eljarrat E, Farre M, Lopez de Alda MJ, Petrovic M, Barcelo D. 2009. Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge. *Trends Anal Chem*, 28: 1263-1275.
- Eguchi K, Nagase H, Ozawa M, Endoh YS, Goto K, Hirata K, Miyamoto K, Yoshimura H. 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, 57: 1733-1738.
- EMA, Note for Guidance: Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products Other Than GMO-Containing and Immunological Products, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Veterinary Medicines Evaluation Unit, EMA/CVMP/055/96-FINAL, 1998.
- EMA, Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Committee for Medicinal Products for Human Use, EMA/CHMP/SWP/4447/00, 2006.
- Ericson H, Thorsén G, Kumblad L. 2010. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquat Toxicol*, 99: 223-231.
- EudraLex – Volume 1 – Pharmaceutical Legislation Medicinal Products for Human Use, On line at: [http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol1\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol1_en.htm) (accessed in 16 February 2009).

- Farag NH, Vincent AS, McKey BS, Whitsett TL, Lovallo WR. 2005. Hemodynamic mechanisms underlying the incomplete tolerance to caffeine's pressor effects. *American J Cardiol*, 95: 1389-92.
- Fastbom J, Pazos A, Ungerstedt U, Rudolphi K, Fredholm BB. 1990. Protective effect of adenosine and a novel xanthine derivative propentofylline on the cell damage after bilateral carotid occlusion in the gerbil hippocampus. *Neurosci*, 22: 813-826.
- Fent K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol let*, 141: 356-365.
- Fent K, Weston A, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol*, 76(2): 122-159.
- Ferrari B, Mons R, Vollat B, Frayse B, Paxéus N, Lo Guidice R. 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem*, 23: 1344-1354.
- Ferre´ S, Fuxe K, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB. 1992. Adenosine–dopamine interactions in the brain. *Neurosci*, 51: 501-512.
- Ferre´ S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K. 1991. Stimulation of high-affinity adenosine A-2 receptors decreases the affinity of dopamine D-2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7237-7241.
- Ferreira AP. 2005. Anthropogenic Pollution in Aquatic Environment: Development of Caffeine as an Indicator. *Int J Environ Health Res*, 15: 303-311.
- Fick J, Lindberg RH, Tysklind M, Larsson DG. 2010. Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol*, 58 (3): 516-23.
- Fisher PMJ, Borland R. 2003. Gauging the pharmaceutical burden on Sydney's environment: a preventive response. *J Clean Prod*, 11: 315-320.
- Flaherty CM, Dodson SI. 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, 61: 200-207.
- Franzellitti S, Buratti S, Valbonesi P, Capuzzo A, Fabbri E. 2011. The  $\beta$ -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*, 101: 299-308.
- Fredholm BB. 1980. Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine?. *Trends Pharmacol Sci*, 1: 129-132.
- Fredholm BB. 1995. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol*, 76: 93-101.

- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. 2001. International union of pharmacology, XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 53: 527-52.
- Gagné F, Blaise C, Fournier M, Hansen PD. 2006. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 143(2): 179-86.
- Gagne F, Blaise C. 2006. Occurrence of Pharmaceutical Products in a Municipal Effluent and Toxicity to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicol Environ Saf*, 64: 329-336.
- Garrett BE, Griffiths RR. 1997. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacol Biochem Behav*, 57: 533-541.
- Garriott JC, Simmons LM, Poklis A, Mackell MA. 1985. Five cases of fatal overdose from caffeine-containing "look-alike" drugs. *J. Anal Toxicol*, 9: 141-144.
- Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P. 1990 (Eds.). Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, eighth ed., *Pergamon Press*, New York.
- Giltrow E, Eccles PD, Winter MJ, McCormack PJ, Rand-Weaver M, Hutchinson TH, Sumpter JP. 2009. Chronic effects assessment and plasma concentrations of the beta-blocker propranolol in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol*, 95: 195-202.
- Glassmeyer ST, Furlong ET, Kolpin DW, Cahill JD, Zaugg SD, Werner SL, Meyer MT, Kryak DD. 2005. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ Sci Technol*, 39: 5157-5169.
- Gómez-Ruiz JA, Leake DS, Ames JM. 2007. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J Agricult Food Chem*, 55: 6962-9.
- Goodman RR, Snyder SH. 1982. Autoradiographic localization of adenosine receptors in rat brain using (3H) cyclohexyladenosine. *J Neurosci*, 2: 1230-1241.
- Groning J, Held C, Garten C, Claussnitzer U, Kaschabek SR, Schlomann M. 2007. Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere*, 69: 509-516.
- Halling-Sorensen B, Nors NS, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, Jorgensen SE. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. A review, *Chemosphere*, 36: 357-393.
- Hartley TR, Lovallo WR, Whitsett TL. 2004. Cardiovascular effects of caffeine in men and women. *Amer J Cardiol*, 93: 1022-6.
- Heberer T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett*, 131: 5-17.

- Houtman C. 2010. Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *J Integrat Environ Sci*, 7: 271-295.
- Huggett DB, Brooks BW, Peterson B, Foran CM, Schlenk D. 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch Environ Contam Toxicol*, 43: 229-35.
- James JE, Stirling KP. 1983. Caffeine: a survey of some of the known and suspected deleterious effects of habitual use. *Brit J Addict* , 78: 251-258.
- Jarvis MF, Williams M. 1989. Direct autoradiographic localization of adenosine A2 receptors in the rat brain using the A2-selective agonist, (3H)CGS 21680. *Eur J Pharmacol*, 168: 243-246.
- Jjemba PK. 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 63: 113-130.
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, 69: 373-386.
- Jones OAH, Voulvoulis N, Lester JN. 2001. Human pharmaceuticals in aquatic environment. A review. *Environ Technol*, 22: 1383-1394.
- Joss A, Keller E, Alder AC, Gobel A, McArdell CS, Ternes T, Siegrist H. 2005. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res*, 39: 3139-3152.
- JRC Scientific and Technical Reports. 2010. MARINE STRATEGY FRAMEWORK DIRECTIVE Task Group 8 Report, Contaminants and pollution effects.
- Kanstrup MH, Petersen AP. 2003. Fatal poisoning with Letigen. *Ugeskr Laeger*, 165: 239-240.
- Kiefer F, Wiebel F. 1998. Caffeine potentiates the formation of micronuclei caused by environmental chemical carcinogens in V79 Chinese hamster cells. *Toxicol Lett*, 96: 131-136.
- Knee KL, Gossett R, Boehm AB, and Paytan A. 2010. Caffeine and Agricultural Pesticide Concentrations in Surface Water and Groundwater on the North Shore of Kauai (Hawaii, USA). *Mar Pollut Bul* (In Press).
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in us streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol*, 36: 1202-1211.
- Komori K, Suzuki Y, Minamiyama M, Harada A. 2013. Occurrence of selected pharmaceuticals in river water in Japan and assessment of their environmental risk . *Environ Monit Assess*, 185: 4529-4536.

- Kummerer K. 2001. Introduction: pharmaceuticals in the environment, in: K. Kummerer (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer, Berlin, 1-8.
- la Cour Jansen J, Ledin A. 2009. Sustainable Wastewater Treatment. In: "A Healthy Future. Pharmaceuticals in a Sustainable Society". Collaborative publication between Apoteket AB, MistraPharma and Stockholm County Council.
- Lam MW, Mabury SA. 2005. Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquat Sci*, 67: 177-188.
- Lawrence JR, Zhu B, Swerhone GDW, Roy J, Tumber V, Waiser MJ, Topp ED, Korber DR. 2012. Molecular and microscopic assessment of the effects of caffeine, acetaminophen, diclofenac and their mixtures on river biofilm communities. *Environ Toxicol Chem*, Vol. 31, 3: 508-517.
- Lear JC, Maillard JY, Dettmar PW, Goddard PA, Russell AD. 2002. Chloroxylenol and triclosan-tolerant bacteria from industrial sources. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 29: 238-242.
- Lim MH, Snyder SA, Sedlak DL. 2008. Use of biodegradable dissolved organic carbon (Bdoc) to assess the potential for transformation of wastewater-derived contaminants in surface waters. *Water Res*, 42: 2943-2952.
- Lin AYC, Yu TH, Lateef SK. 2009. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *J Hazard Mater*, 167: 1163-1169.
- Lindqvist N, Tuhkanen T, Kronberg L. 2005. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Res*, 39: 2219-2228.
- Livingstone DR, Nasci C, Solè M, Da Ros L, O'Hara S, Peters L, Fossato V, Wooton AN, Goldfarb PS. 1997. Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5' hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. *Aquat Toxicol*, 38: 205-224.
- Marine Strategy Framework Directive. DIRECTIVE 2008/56/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL EN Official Journal of the European Union 25.6.2008.
- Matamoros V, Arias C, Brix H, Bayona JM. 2009. Preliminary screening of smallscale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. *Water Res*, 43: 55-62.
- McCarthy JF, Shugart LR. 1991. Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability. Publication no. 3072, ORNL/TM-11783. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.

- Mennigen JA, Stroud P, Zamora JM, Moon TW, Trudeau VL. 2011. Pharmaceuticals as neuroendocrine disruptors: lessons learned from fish on Prozac. *J Toxicol Environ Health B*, 14: 387-412.
- Mesas AE, Leon-Muñoz LM, Rodríguez-Artalejo F, López-García E. 2011. The effect of coffee on blood pressure and cardiovascular disease in hypertensive individuals: a systematic review and meta-analysis. *Amer J Clin Nutr*, 94: 1113-26.
- Metcalf CD, Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Yernes TA, Hirsch R. 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canada sewage treatment plants. *Environ Toxicol Chem*, 22: 2872-2880.
- Meyer MT, Bumgarner JE, Varns JL, Daughtridge JV, Thurman EM, Hostetler KA. 2000. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry. *Sci Total Environment*, 248: 181-187.
- Miege C, Choubert JM, Ribeiro L, Eusebe M, Coquery M. 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants conception of a database and first results. *Environ Pollut*, 157: 1721-6.
- Mohamed MN, Lawrence JR, Robarts RD. 1998. Phosphorus limitation of heterotrophic biofilms from the Fraser River, British Columbia, and the effect of pulp mill effluent. *Microb Ecol*, 36: 121-130.
- Mompelat S, Le Bot B, Thomas O. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ Internat*, 35: 803-814.
- Mompelat S, Thomas O, Le Bot B. 2011. Contamination levels of human pharmaceutical compounds in French surface and drinking water. *J Environ Monit*, 13: 2929-2939.
- Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Leonard DRP. 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res*, 552: 247-268.
- Moore MN, Allen JJ, McVeigh A. 2006. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar Environ Res*, 61: 278-304.
- Moore MN, Viarengo A, Donkin P, and Hawkins AJS. 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat Toxicol*, 84: 80-91.
- Moore MN, Koehler A, Lowe D, Viarengo A. 2008. Lysosomes and autophagy in aquatic animals. *Met enzymol*, 451: 581-620.
- Moore MT, Greenway SL, Farris JL, Guerra B. 2008. Assessing Caffeine as an Emerging Environmental Concern Using Conventional Approaches. *Arch Environ Contaminat Toxicol*, 54: 31-35.

- Munkittrick KR, McCarthy LS. 1995. *J. Aquat Ecosystem Health*, 4: 77-90.
- Murray KE, Thomas SM, Bodour AA. 2010. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ Pollut*, 158: 3462-3471.
- Nakada N, Kiri K, Shinohara H, Harada A, Kuroda K, Takisawa S, Takada H. 2008. Evaluation of Pharmaceuticals and Personal Care Products as Water Soluble Molecular Markers of Sewage. *Environ Sci Technol*, 42: 6347-6353.
- Nehlig A, Daval JL, Debry G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev*, 17: 139-170.
- Nehlig A, Debry G. 1994. Effects of coffee on the central nervous system. In: Debry G, editor. *Coffee and health*. London: Libbey, 157-249.
- Ohta A, Sitkovsky M. 2011. Methylxanthines, inflammation, and cancer: fundamental mechanisms. *Handbook Exp Pharmacol*, 200: 469-81.
- Ongini E, Fredholm BB. 1996. Pharmacology of adenosine A2 receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 17: 364-372.
- Oppel J, Broll G, Loffler D, Meller M, Rombke J, Ternes T. 2004. Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Sci Total Environment*, 328: 265-273.
- OSPAR Commission MSFD Advice Document on Good environmental status-Descriptor 8: Contaminants. Version 2 March 2012.
- Pal A, Gin AYC, Reinhard M. 2010. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci Total Environment*, 408: 6062-6069.
- Palo AK, Choudhury RC. 2006. Modulation of methotrexate-induced cytogenotoxicity in mouse spermatogonia and its transmission in the male germline by caffeine. *Environ Toxicol Pharmacol*, 21(3): 254-259.
- Parkinson FE, Fredholm BB. 1990. Autoradiographic evidence for Gprotein coupled A2-receptors in rat neostriatum using (3H)-CGS 21680 as a ligand. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 342: 85-89.
- Parrott JL, Bennie DT. 2009. Life-cycle exposure of fathead minnows to a mixture of six common pharmaceuticals and triclosan. *J Toxicol Environ Health A*, 72: 633-641.
- Paxeus N. 2004. Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, beta-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Sci Technol*, 50: 253-260.

- Payne JF, Fancey LL, Rahimtula AD, Porter EL. 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Compar Biochem Physiol*, 86C: 233-245.
- Peeler KA, Opsahl SP, Chanton JP. 2006. Tracking Anthropogenic Inputs Using Caffeine, Indicator Bacteria, and Nutrients in Rural Freshwater and Urban Marine Systems. *Environ Sci Technol*, 40: 7616-7266.
- Pham TT, Proulx S. 1997. PCBs and PAHs in the montreal urban community (Quebec, Canada) wastewater treatment plant and in the effluent plume in the St Lawrence river. *Water Res*, 31 (8):1887-1896.
- Pincomb GA, Lovallo WR, Passey RB, Whitsett TL, Silverstein SM, Wilson MF. 1985. Effects of caffeine on vascular resistance, cardiac output and myocardial contractility in young men. *Amer J Cardiol*, 56: 119-22.
- Pollack AE, Fink JS. 1995. Adenosine antagonists potentiate D2 dopamindependent activation of fos in the striatopallidal pathway. *Neurosci*, 68: 721-728.
- Pollack K, Balazs K, Oginseitán O. 2009. Proteomic Assessment of Caffeine Effects on Coral Symbionts. *Environ Sci Technol*, 43: 2085-2091.
- Pruvot B, Quiroz Y, Voncken A, Jeanray N, Piot A, Martial JA, Muller M. 2012. A panel of biological tests reveals developmental effects of pharmaceutical pollutants on late stage zebrafish embryos. *Reprod Toxicol*, 34: 568-583.
- Quinn B, Gagne F, Blaise C. 2008. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci Total Environ*, 389: 306-314.
- Quinn B, Gagne F, Blaise C. 2009. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci Total Environ*, 407: 1072-1079.
- Quinn B, Schmidt W, O'Rourke K, Hernan R. 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere*, 84(5): 657-63.
- Regoli F, Giuliani ME. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar Environ Res*, 93: 106-117.
- Renda G, Zimarino M, Antonucci I, et al. 2012. Genetic determinants of blood pressure responses to caffeine drinking. *Amer J Clin Nutr*, 95: 241-8.
- Richardson ML, Bowron JM. 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol*, 37: 1-12.
- Riksen NP, Smits P, Rongen GA. 2011. The cardiovascular effects of methylxanthines. *Handbook Exp Pharmacol*, 200: 413-37.

- Roberts PH, Thomas KV. 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci Total Environ*, 356: 143-153.
- Robertson D, Frölich JC, Carr RK, et al. 1978. Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *NE J Medic*, 298: 181-6.
- Rodriguez del Rey Z, Granek EF, Sylvester S. 2012. Occurrence and concentration of caffeine in Oregon coastal waters. *Mar Pollut Bullet*, 64: 1417-1424.
- Rosal R, Rodriguez A, Perdigon-Melon JA, Petre A, Garcia-Calvo E, Gomez MJ, Aguera A, Fernandez-Alba AR. 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res*, 44: 578-588.
- Rounds SA, Doyle MC, Edwards PM, Furlong ET. 2009. Reconnaissance of pharmaceutical chemicals in urban streams of the Tualatin River basin, Oregon, 2002. In: *US Geological Survey Scientific Investigations Report 2009-5119, US Government Printing Office, Washington, DC*, 22p. <<http://www.pubs.usgs.gov/sir/2009/5119/>>.
- Säfhholm M, Norder A, Fick J, Berg C. 2012. Disrupted oogenesis in the frog *Xenopus tropicalis* after exposure to environmental progestin concentrations. *Biol Reprod*, 86(4): 126.
- Santos LHMLM, Araujo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MCBSM. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mat*, 175: 45-95.
- Scheytt T, Mersmann P, Leidig M, Pekdeger A, Heberer T. 2004. Transport of pharmaceutically active compounds in saturated laboratory columns. *Ground Water*, 42: 767-773.
- Schmidt W, O'Rourke K, Hernan R, Quinn B. 2011. Effects of pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity test. *Mar Pollut Bullet*, 62: 1389-1395.
- Schmitt H, Boucard T, Garric J, Jensen J, Parrott J, Péry A, Römbke J, Straub JO, Hutchinson TH, Sánchez Argüello P, Wennmalm A, Duis K. 2009. Recommendations on the environmental risk assessment of pharmaceuticals: Effect characterization. *Integr Environ Assess Manag*, 6: 588-602.
- Schulman LJ, Sargent EV, Naumann BD, Faria EC, Dolan DG, Wargo JP. 2002. A human health risk assessment of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Hum Ecological Risk Assess*, 8: 657-680.
- Schwab BW, Hayes EP, Fiori JM, Mastrocco FJ, Roden NM, Cragin D, Meyerhoff RD, D'Aco VJ, Anderson PD. 2005. Human pharmaceuticals in US surface waters: a human health risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*, 42: 296-312.

- Sedlak DL, Pinkston KE. 2001. Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals released to the aquatic environment. *Water Res*, 120: 56-64.
- Seiler JP. 2002. Pharmacodynamic activities of drug and ecotoxicology-can the two be connected. *Toxicol Lett*, 131: 137-143.
- Seiler RL, Zaugg SD, Thomas JM, Howcroft DL. 1999. Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. *Ground Water*, 37: 405-410.
- Siegener R, Chen RF. 2002. Caffeine in Boston Harbor Sea Water. *Mar Pollut Bullet*, 44: 383-387.
- Singh SP, Azua A, Chaudhary A, Khan S, Willett KL, Gardineli PR. 2010. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. *Ecotoxicol*, 19: 338-350.
- Snyder SA, Leising J, Westerhoff P, Yoon Y, Mash H, Vanderford B. 2004. Biological and physical attenuation of endocrine disruptors and pharmaceuticals: implications for water reuse. *Ground Water Monit Remediat*, 24: 108-118.
- Solé M, Shaw JP, Frickers PE, Readman JW, Hutchinson TH. 2010. Effects of feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Anal Bioanal Chem*, 396: 649-656.
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall LW, Williams WM. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem*, 15: 31-76.
- Sonnenschein C, Soto AM. 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65: 143-150.
- Spiller MA. 1998. The chemical components of coffee. In: Spiller GA, editor. *Caffeine. Boca Raton: CRC Press*, 97-161.
- Standley LJ, Rudel RA, Sawtz CH, Atfield KR, Christian J, Erickson M, Brody JG. 2008. Wastewater-Contaminated Groundwater as a Source of Endogenous Hormones and Pharmaceuticals to Surface Water Ecosystems. *Environ Toxicol Chem*, 27: 2457-2468.
- Stebbing ARD. 1985. Organotins and water quality-Some lessons to be learned. *Mar Pollut Bullet*, 16: 383-390.
- Stegeman JJ, Brouwer M, Richard TDG, Förlin L, Fowler BA, Sanders BM, van Veld PA. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle PM, Bergman HL (Eds.): *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Hystological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 235-335.

- Strubelt O, Diederich KW. 1999. Experimental treatment of the acute cardiovascular toxicity of caffeine. *J Toxicol Clin Toxicol*, 37: 29-33.
- Stumpf M, Ternes TA, Wilken RD, Rodrigues Baumann WSV. 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ*, 225 (1/2): 135-141.
- Taggart MA, Cuthbert R, Das D, Sashikumar C, Pain DJ, Green RE, Feltrer Y, Shultz S, Cunningham AA, Meharg AA. 2007. Diclofenac disposition in Indian cow and goat with reference to Gyps vulture population declines. *Environ Pollut*, 147(1): 60-5.
- Tambosi JL, Yamanaka LY, José HJ, Muniz Moreira RFP. 2010. Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP). *Quin nova*, 33(2): 411-420.
- Ternes T, Jos A, Siegrist H. 2004. Scrutinizing pharmaceutical and personal care products in wastewater treatment. *Environ Sci Technol*, 393-399.
- Ternes TA, Meisenheimer M, McDowell D, Sacher F, Brauch HJ, Haist-Gulde B, Preuss G, Wilme U, Zulei-Seibert N. 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ Sci Technol*, 36(17): 3855-3863.
- Ternes TA. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res*, 32: 3245-3260.
- Ternes TA, Stuber J, Hermann N, McDowell D, Ried A, Kampmann M, Tieser B. 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Res*, 37: 1976-1982.
- Thomas L, Russell AD, Maillard JY. 2005. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. *J Appl Microbiol*, 98: 533-543.
- TIAFT homepage 2002. Therapeutic and toxic drug concentrations, <http://www.tiaft.org>.
- Tixier C, Singer HP, Oellers S, Muller SR. 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environ Sci Technol*, 37: 1061-1068.
- United Nations Environment Programme Mediterranean Action Plan (UNEP). 2002. Caffeine. CAS: 58-08-2.
- U.S. EPA Office of Pollution Prevention and Toxics. 2002. EPA's Green Chemistry Program. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency. Available: <http://www.epa.gov/greenchemistry>[accessed 10 May 2002].
- Urase T, Kikuta T. 2005. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Res*, 39 (7): 1289-1300.

- Viarengo A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat Sci Review*, 1: 295-317.
- Viarengo A, Lowe D, Bolognesi F, Fabbri E, Koehler A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Physiol C*, 146: 281-300.
- Vogelsang C, Grung M, Jantsch TG, Tollefsen KE, Liltved H. 2006. Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway. *Water Res*, 40: 3559-3570.
- Wadhia K, Thompson KC. 2007. Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotest for potential implementation of the Water Framework Directive. *Trend Anal Chem*, 26(4): 300-307.
- Walker CH. 1998. Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. *Environ Health Perspect Suppl*, 106(Suppl 2): 613-621.
- Webb SF. 2001. A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II: aquatic risk characterisation. In: Kummerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks. Springer-Verlag, Berlin*, 319-343.
- Weigel S, Bester K, Huhnerfuss H. 2001. New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography– mass spectrometry. *J Chromatogr*, 912: 151-161.
- Weigel S, Kuhlmann J, Huhnerfuss H. 2002. Drugs and Personal Care Products as Ubiquitous Pollutants: Occurrence and Distribution of Clofibric Acid, Caffeine, and DEET in the North Sea. *Sci Total Environ*, 295: 131-141.
- Weigel S, Berger U, Jensen E, Kallenborn R, Thoresen H, Huhnerfuss H. 2004. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56: 583-592.
- Wells MJM. 2006. Log Dow: key to understanding and regulating wastewater-derived contaminants. *Environ Chem*, 3: 439-449.
- Winek CL, Wahba WW, Winek Jr. CL, Winek Balzer T. 2001. Drug and chemical blood-level data 2001. *Forensic Sci Int*, 122: 107-123.
- Winter MJ, Owen SF, Murray-Smith R, Panter GH, Hetheridge MJ and Kinterz LB. 2009. Using Data from Drug Discovery and Development To Aid the Aquatic Environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals: Concepts, Considerations, and Challenges. *Int Environ Assess Manag*, Volume 6, Number 1: 38-51.

- Ying GG, Kookana RS. 2003. Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment. *Environ Sci Technol*, 37: 1256-1260.
- Zabczynski S, Buntner D, Miksch K, Roig B. 2010. Performance of conventional treatment processes of the most resistant PPs. In: Benoit R, editor. Pharmaceuticals in the environment: current knowledge and need assessment to reduce presence and impact. London: IWA Publishing, 87-113.
- Zuehlke S, Duennbier U, Heberer T, Fritz B. 2004. Analysis of endocrine disrupting steroids: investigation of their release into the environment and their behaviour during bank filtration. *Ground Water Monit Remed*, 24: 78-85.
- Zwiener C, Gremm TJ, Frimmel FH. 2001. Pharmaceutical residues in the aquatic environment and their significance for drinking water production, in: K.Kummerer (Ed.), Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. *Springer*, Berlin, 81-89.



