



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale Biologia Marina (LM-6)

**POTENZIALE ECOTOSSICOLOGICO DI UNA MISCELA DI
FARMACI NEL MITILO MEDITERRANEO *MYTILUS
GALLOPROVINCIALIS***

ECOTOXICOLOGICAL POTENTIAL OF DRUG MIXTURES IN THE
MEDITERRANEAN MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Relatore:
Chiar.mo Prof. Stefania Gorbi

Tesi di Laurea di:
Federica Buttari

Correlatrice:
Dr. Marica Mezzelani

Sessione accademica 2020/2021

Sommario

Indice delle figure.....	II
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Farmaci come contaminanti emergenti.....	3
1.1.1. Interazione dei farmaci nell'ambiente marino	9
1.2 Approccio ecotossicologico integrato: bioaccumulo e biomarker	13
2. SCOPO DELLA TESI.....	18
3. MATERIALI E METODI.....	19
3.1 Piano sperimentale.....	19
3.2 Metodologie per le analisi chimiche.....	20
3.3 Metodologie per le analisi biologiche	23
4. RISULTATI.....	30
5. DISCUSSIONE.....	42
6. CONCLUSIONE	49
Bibliografia.....	51

Indice delle figure

Figura 1 Ciclo di vita di un farmaco (Pharmecure).....	5
Figura 2 Soluzioni tecniche ritenute efficaci nella rimozione dei microinquinanti (Kosek et al., 2020).....	7
Figura 3. Microinquinanti, inclusi prodotti farmaceutici, antibiotici e ormoni inclusi nella Watch List 1 e Watch List 2 dell'UE (Kosek et al., 2020).....	9
Figura 4. Concentrazione dei farmaci rilevati nei tessuti molli di <i>Mytilus galloprovincialis</i> ..	31
Figura 5. Risposte del sistema immunitario e danno genotossico.....	34
Figura 6. Risposte cellulari specifiche.	36
Figura 7. Risposte dei biomarker cellulari analizzate sui mitili esposti.....	38
Figura 8. Risposte del sistema antiossidante analizzate sugli esposti.	40

1. INTRODUZIONE

1.1 Farmaci come contaminanti emergenti

Per molti anni le attività di ricerca scientifica e di monitoraggio ambientale si sono concentrate sullo studio contaminanti come IPA, PCB, metalli pesanti. Queste indagini hanno portato alla comprensione dettagliata della loro caratteristiche in termini di presenza, diffusione e tossicità, permettendo ai paesi industrializzati di applicare specifiche politiche di decontaminazione, che hanno portato la drastica riduzione delle concentrazioni ambientali di queste sostanze attualmente definite convenzionali (o tradizionali) (Manzo et al., 2014). Negli ultimi decenni, l'interesse della comunità scientifica e degli enti di protezione ambientale si è spostato verso i cosiddetti "Emerging Compounds" (ECs) o Contaminants of Emerging Concern (CECs) definiti come: "sostanze chimiche o materiali naturali, fabbricati o artificiali che sono stati scoperti o si sospetta siano presenti in vari comparti ambientali e la cui tossicità o persistenza potrebbe alterare il metabolismo di un organismo in modo significativo" (Sauve et al., 2018). Inoltre, alla mancanza di informazioni sul potenziale rischio di queste sostanze, sia per l'ambiente che per l'uomo, si aggiunge anche l'assenza di normative specifiche finalizzate alla regolamentazione delle loro concentrazioni negli ambienti naturali. Sebbene i progressi della farmacologia umana e veterinaria, rappresentino uno dei maggiori benefici della società moderna nel trattamento di numerose patologie, l'aumento dei consumi di questi composti ha determinato la presenza ubiquitaria dei farmaci negli ecosistemi marini. Tali contaminanti sono stati rilevati nell'acqua di mare e nei sedimenti di tutto il mondo, con livelli variabili compresi rispettivamente tra ng-µg/L e ng/g (Mezzelani et al., 2018, 2020). A differenza degli inquinanti chimici tradizionali infatti, i medicinali sono composti bioattivi, progettati per essere efficaci a concentrazioni molto basse, e hanno la capacità di interferire con il biota marino durante l'intero ciclo di vita (Bebiano e Gonzalez-Rey, 2015; Fent et al., 2006; Mezzelani et al., 2016a; b; Santos et al., 2010; Mezzelani et al., 2018). Secondo uno studio di Martínez et al. (2007) oltre 2,3 miliardi di persone (il 41% della popolazione mondiale) vivono entro i limiti costieri e oltre il 50% dei paesi costieri ha 80 - 100% della popolazione entro i 100 km dalla costa. Tali tendenze suggeriscono un possibile aumento di input di prodotti farmaceutici umani

nell'ambiente e quindi la necessità di affrontare i potenziali scenari che potrebbero verificarsi (Gaw et al., 2014). Nell'Unione Europea circa 3000 sostanze diverse sono utilizzate dalla medicina umana come analgesici e farmaci antinfiammatori, contraccettivi, antibiotici (sulfonamidi e macrolidi), beta-bloccanti (propranololo), regolatori di colesterolo e lipidi (colifibrati e statine), composti neuroattivi (caffeina, carbamazepina, fluoxetina e morfina) e molti altri (Fent et al., 2006).

Tra le varie fonti di introduzione dei farmaci in ambiente, gli scarichi urbani, contribuiscono principalmente all'inquinamento ambientale; in aggiunta troviamo scarichi industriali, ospedalieri, runoff dei terreni agricoli e acquacoltura, nell'ambito della quale una vasta gamma di medicinali veterinari, inclusi antibiotici, viene somministrata a scopo profilattico per controllare i focolai di malattie. Molti dei farmaci assunti, dopo aver svolto la loro funzione, vengono escreti assieme alle urine e alle feci come composti tal quali, metaboliti o molecole inattive. Assieme alle acque fognarie raggiungono i depuratori urbani, che non sono progettati per degradare le sostanze attive di origine farmaceutica, per cui si riversano nei fiumi e laghi, fino al mare, mantenendo la propria efficacia e contribuendo a un inquinamento diffuso (Zuccato et al., 2007).

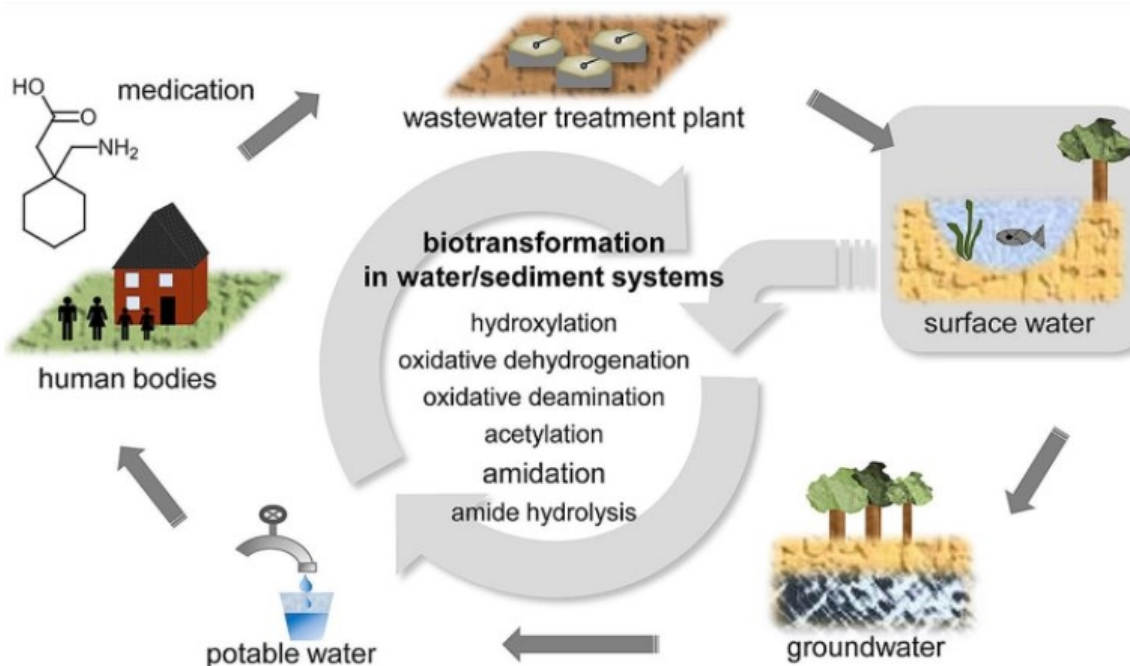


Figura 1 Ciclo di vita di un farmaco (Pharmecure).

Una volta nell'ambiente, a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche, il farmaco viene degradato o può persistere a lungo. Farmaci come eritromicina, ciclofosfamide, naprossene hanno una vita media superiore ad un anno; altri come l'acido clofibrico hanno una persistenza media ambientale di circa 21 anni (Zuccato et al., 2007).

Pertanto, valutare l'efficacia degli impianti di depurazione per rimuovere questi composti è di vitale importanza per una migliore gestione ambientale e promuovere l'economia (bio) circolare (Fernandez-Lopez et al., 2021). Negli impianti convenzionali, la depurazione delle acque reflue prevede "trattamenti primari" e "trattamenti secondari". Nel primo vengono rimosse le particelle non solubili più grandi ed è caratterizzato da: grigliatura, dissabbiatura e disoleatura. Dal dissabbiatore e disoleatore l'acqua scorre nelle vasche di sedimentazione primaria, dove le condizioni idrauliche sono tali da permettere il deposito dei solidi sedimentabili e formare il fango primario (ECO CENTER). I trattamenti secondari rimuovono le impurità organiche e prevedono: ossidazione biologica, dove viene potenziato il fenomeno naturale dell'autodepurazione

delle acque ad opera di batteri (fanghi attivi), e la sedimentazione secondaria in cui le sostanze inquinanti incorporate nei fanghi sedimentano e vengono avviati al trattamento della linea fanghi (CULLIGAN). In alcuni impianti è previsto anche un trattamento “terziario”, finalizzato ad esempio per un successivo utilizzo del refluo in irrigazione (Fernandez-Lopez et al., 2021). Tra i fattori che determinano l'efficacia della rimozione dei microinquinanti c'è da considerare le proprietà degli inquinanti stessi: peso molecolare, carica, adsorbimento, idrofobicità, biodegradabilità, volatilità. Sono importanti anche altri fattori, come le condizioni operative dell'impianto tra cui il tempo di ritenzione idraulica, il pH e la temperatura delle acque reflue (Nam et al., 2017; Kosek et al., 2020).

Considerando l'eterogeneità delle caratteristiche fisico-chimiche dei composti farmaceutici, non è possibile applicare un'unica tecnologia di abbattimento di queste sostanze.

Recentemente, un gran numero di studi ha dimostrato che l'implementazione di tecnologie avanzate che coinvolgono l'irradiazione da ultravioletti (UV) e la filtrazione tramite membrane come l'ozonizzazione e trattamento con carbone attivo sono in grado di eliminare un'ampia gamma di microinquinanti a costi ragionevoli (Swedish Environmental Protection Agency Report 6766, 2018; Mulder et al., 2015). Uno dei vantaggi dell'utilizzo dell'ozonizzazione in soluzioni acquose è che i radicali idrossilici (OH^\cdot), generati dall'auto-decomposizione dell'ozono in acqua, reagiscono in modo non selettivo con i farmaci e altri microinquinanti. L'ozonizzazione riduce inoltre alcuni effetti ecotossicologici, in particolare l'attività estrogenica (Zimmermann et al., 2011). Ci sono anche alcuni svantaggi di questo metodo: in un ambiente acido, la decomposizione spontanea dell'ozono in radicali liberi è limitata, in un ambiente neutro, il decadimento è solo parziale e infine, in presenza di elementi chimici in tracce (e.g. Bromuri, Cloruri, etc.), il processo di ozonizzazione può portare alla formazione di intermedi, che possono essere più tossici dei composti originari, pertanto sono necessari ulteriori studi per ottimizzare l'utilizzo di questa tecnologia (Zimmermann et al., 2011; Kosek et al., 2020). Il carbone attivo è ampiamente utilizzato come adsorbente in molti processi industriali grazie alla sua struttura microporosa e omogenea; L'efficacia del carbone attivo nella rimozione dei microinquinanti, è generalmente collegata alle proprietà fisiche dei composti, in grado quindi di adsorbire facilmente alla sua superficie. I vantaggi di questa

tecnologia includono la semplicità di applicazione, funzionamento e manutenzione (Kosek et al., 2020).

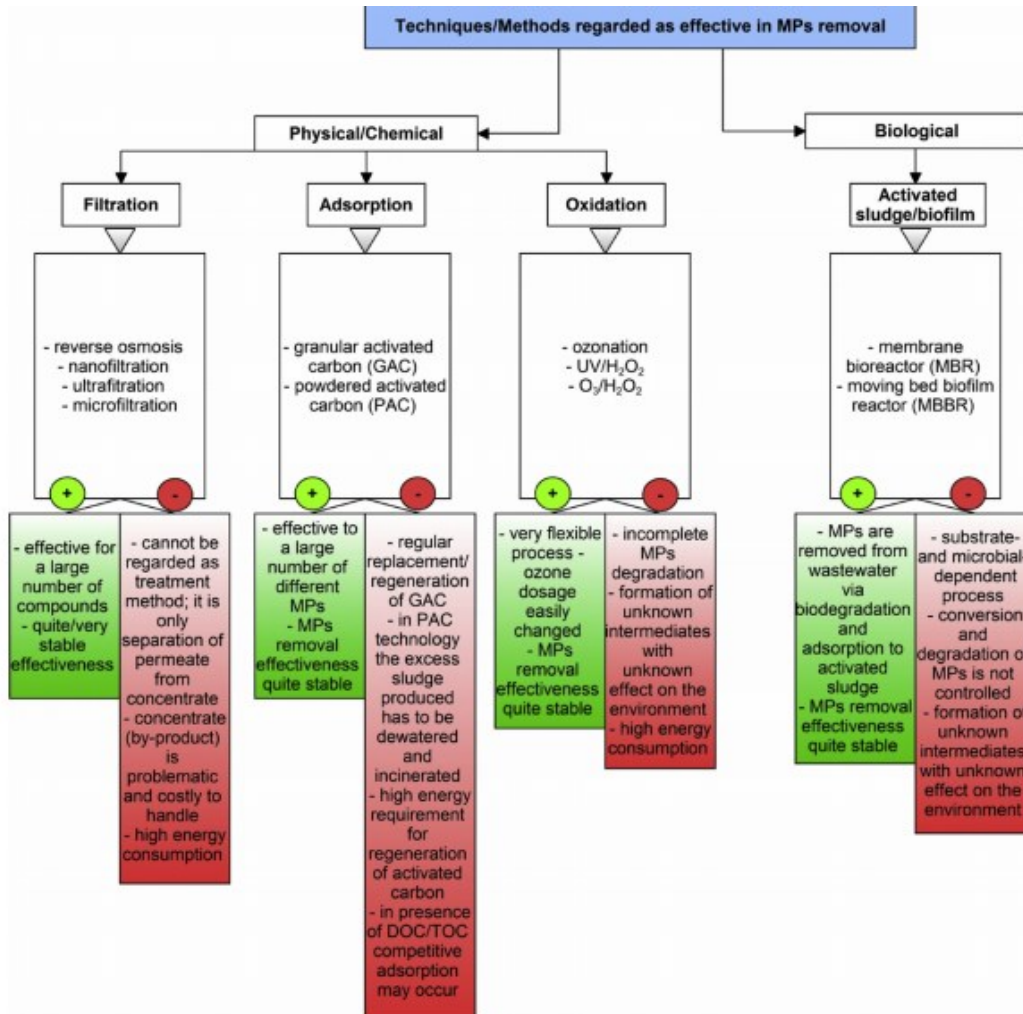


Figura 2 Soluzioni tecniche ritenute efficaci nella rimozione dei microinquinanti (Kosek et al., 2020).

Per quanto concerne il campo legislativo, solo negli ultimi anni, le agenzie di regolamentazione hanno emesso linee guida dettagliate su come valutare i prodotti farmaceutici per i possibili effetti indesiderati sull'ambiente. Il primo requisito per i test di ecotossicità come prerequisito per la registrazione dei prodotti farmaceutici è stato

stabilito nel 1995 secondo la Direttiva dell'Unione Europea (UE) 92/18 CEE e la corrispondente "Nota di orientamento" (EMEA, 1998) per i prodotti farmaceutici veterinari. La Commissione Europea ha pubblicato una bozza di linea guida (Direttiva 2001/83/CE) che specifica che un'autorizzazione per un medicinale per uso umano deve essere accompagnata da una valutazione del rischio ambientale (EMEA, 2005). La procedura viene divisa in due fasi: nella fase I viene calcolata la concentrazione ambientale prevista (PEC) per le acque superficiali e viene misurata la distribuzione. Se la PEC è uguale o superiore a un valore di attivazione di 0,01 µg/L, viene eseguita una seconda fase di analisi, incentrata su studi sulle proprietà fisico-chimiche, sul destino ambientale e sugli effetti ecotossicologici del principio attivo. Alcune sostanze (ad es. principi attivi endocrini e antiparassitari) dovrebbero entrare nella Fase II indipendentemente dal loro valore PEC, perché possono influenzare gli organismi nell'ambiente a concentrazioni <0,01 µg/L (EMA, 2018). Analogamente all'UE, la Food and Drug Administration statunitense (FDA) ha pubblicato una guida per la valutazione dei prodotti farmaceutici; in base a ciò, gli Stati Uniti sono tenuti a fornire un rapporto di valutazione ambientale quando la concentrazione prevista per l'introduzione del principio attivo del farmaco nell'ambiente acquatico è ≥ 1 g/L (FDA-CDER, 1998) (Fent et al., 2006). Nel 2013 l'Unione Europea emana la Direttiva 2013/39/UE (Direttiva, 2013) e istituisce un meccanismo di Watch List: un elenco di controllo che indica i potenziali inquinanti dell'acqua che dovrebbero essere temporaneamente monitorati nelle acque superficiali per ottenere un insieme di dati di alta qualità a livello di Unione. La Watch List 1 è stata pubblicata nel 2015 (decisione di esecuzione UE della Commissione, 2015) e includeva dieci sostanze. La revisione della Watch List 1 ha portato alla Watch List 2 (decisione di esecuzione della Commissione UE, 2018) in cui la Commissione ha rimosso cinque sostanze per le quali si sono ottenuti dati di monitoraggio di qualità sufficientemente elevata (diclofenac, gli erbicidi oxadiazon e triallate, l'ingrediente per la protezione solare 2-etilesile 4-metossicinnamato e il composto industriale 2,6-di-terz-butil-4-metilfenolo), mentre sono state inserite tre nuove sostanze (il pesticida metaflumizone e i due antibiotici amoxicillina e ciprofloxacina). Si può concludere che la rimozione dei prodotti farmaceutici dalle acque reflue oggi non è prevista all'interno dell'Unione europea, ma il loro monitoraggio è stato incluso nella Watch List 1 e nella Watch List 2 (Kosek et al., 2020).

Watch List 1 2015	Compounds	Watch List 2 2018
	Pharmaceuticals	
X	Diclofenac	–
–	Clprofloxacin	X
–	Amoxicillin	X
X	Macrolide antibiotics (Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin)	X
	Synthetic and natural hormones	
X	Estrone (E1)	X
X	17-Beta-estradiol (E2)	X
X	17-Alpha-ethinylestradiol (EE2)	X
	Sunscreen Ingredients	
X	2-Ethylhexyl 4-methoxycinnamate	–
	Pesticides	
X	Methiocarb	X
	Herbicides	
X	Tri-allate	–
X	Oxadiazon	–
	Insecticides	
X	Neonicotinoids (Imidacloprid, Thiacloprid, Thiamethoxam, Clothianidin, Acetamiprid)	X
–	Metaflumzone	X
	Industrial compounds	
X	2,6-ditert-butyl-4-methylphenol	–

Figura 3. Microinquinanti, inclusi prodotti farmaceutici, antibiotici e ormoni inclusi nella Watch List 1 e Watch List 2 dell'UE (Kosek et al., 2020)

1.1.1. Interazione dei farmaci nell'ambiente marino

Come citato in precedenza, i farmaci sono composti il cui principio attivo è stato progettato per agire a basse concentrazioni su specifiche vie metaboliche e molecolari nell'uomo, così come negli animali. Il loro costante utilizzo e rilascio nell'ambiente conferisce a queste molecole un comportamento di pseudo-persistenza, suggerendo la necessità di caratterizzare il bioaccumulo e gli effetti biologici in organismi non bersaglio, per valutare il potenziale rischio tossicologico (Mezzelani et al., 2018a). Gli organismi marini, infatti, sono esposti a questi contaminanti per il loro intero ciclo vitale e potrebbero subire gli stessi effetti in quanto i target molecolari su cui i medicinali agiscono sono conservati anche nelle specie non target. Per diverso tempo i farmaci non sono stati considerati dannosi per gli oceani, in riferimento all'elevata capacità di diluizione delle acque marine (Fabbri e Franzellitti, 2015). Ad oggi numerosi studi hanno

dimostrato la loro presenza non solo negli ambienti di acqua dolce come laghi, fiumi, ma anche nelle aree costiere. Nel complesso ritroviamo valori più elevati nelle acque dolci rispetto ai sistemi marini, influenzati significativamente dalle condizioni chimico-fisiche tra cui salinità e pH. È più probabile che composti idrofili persistano nella colonna d'acqua, mentre le molecole lipofile, assorbite dalla materia organica sospesa, possono essere convogliate nei sedimenti (Bebiano e Gonzalez-Rey, 2015; Ebele et al., 2017; Peake et al., 2016; Santos et al., 2010); questi possono essere risospesi durante i cambiamenti di marea, agendo come fonte secondaria d'inquinamento, esponendo il biota marino ai farmaci assorbiti (Gaw et al., 2014). Sono stati rilevati vari composti in specie selvatiche come macroalghe (*Saccharina* spp., *Laminaria* spp.), molluschi (*Mytilus* spp., *Cassostrea* spp., *Dreissena* spp., *Elliptio* spp.), crostacei (*Gammarus* spp.) e pesci appartenenti a diverse categorie ecologiche (Álvarez-Muñoz et al., 2015; Bringolf et al., 2010; Gaw et al., 2014; Klosterhaus et al., 2013; Liu et al., 2015; Maruya et al., 2012; Martinez-Bueno et al., 2014; McEneff et al., 2014; Mezzelani et al., 2016a; Moreno-González et al., 2016; Wille et al., 2011). Per di più, nell'epoca dei cambiamenti climatici, c'è la necessità di interrogarsi sui possibili effetti che le variazioni di temperatura e cambiamenti oceanici avranno sulla biodisponibilità e tossicità di tali composti emergenti. La riduzione del pH, oltre a modulare indirettamente il bioaccumulo, ha effetti diretti su diverse vie metaboliche negli organismi marini, come immunocompetenza, stato ossidativo, crescita e riproduzione (Gazeau et al., 2013; Kroeker et al., 2010). Recenti studi sull'interazione tra acidificazione degli oceani e farmaci hanno rilevato un aumento sinergico della tossicità della carbamazepina (3 µg/L) in *Scrobicularia plana* a pH 7,1, con una riduzione della sopravvivenza degli organismi e un aumento dello stress ossidativo (Mezzelani et al., 2021; Freitas et al., 2016).

Un'ulteriore complicazione deriva dal fatto che negli ecosistemi acquatici i farmaci non sono presenti come composti isolati, ma formano miscele complesse. Comprendere se gli effetti additivi o sinergici possono alterare l'azione delle singole molecole sta diventando una priorità scientifica (Mezzelani et al., 2018a). DeLorenzo & Fleming nel 2008 hanno studiato la tossicità di sei farmaci e prodotti per la cura personale nella specie di fitoplancton marino *Dunaliella tertiolecta*, sia singolarmente che in miscele binarie, e hanno riportato tossicità additiva per una miscela contenente simvastatina e acido

clofibrico (Gaw et al., 2014). Franzellitti et al. nel 2013 hanno rilevato effetti antagonistici del propranololo e fluoxetina sul *Mytilus galloprovincialis* quando dosati a 0,3 ng/L per 7 giorni. La fluoxetina ha indotto l'espressione genica del recettore della serotonina (5-HT1) e il propranololo ha neutralizzato tale effetto, solo quando presente in miscela con la fluoxetina (Mezzelani et al., 2018a). Tra le varie molecole misurate sia in colonna d'acqua che negli organismi marini, la Carbamazepina (CBZ) è una delle più persistenti (Mezzelani et al., 2021). La carbamazepina è stata approvata dalla FDA nel 1968, ed è un farmaco ad attività anticonvulsivante usato principalmente nel trattamento delle crisi epilettiche, delle nevralgie del trigemino e disturbi psichiatrici. Sebbene il meccanismo d'azione non sia del tutto chiaro, l'attività antiepilettica sembra essere imputabile al blocco dei canali del sodio voltaggio-dipendenti: in questo modo l'eccitabilità neuronale viene ridotta (Fabbri, 2015; Martin Diaz et al., 2009). Le specifiche proprietà refrattarie, rendono la CBZ resistente ai trattamenti convenzionali dell'acqua (l'efficienza media di rimozione dagli impianti di trattamento delle acque reflue è inferiore al 10%), biotratamenti e fotodegradazione (Zhu et al., 2019). L'emivita della carbamazepina nella colonna d'acqua è compresa tra 4,5 e 25 giorni nella stagione estiva per la degradazione tramite fotolisi diretta (Calisto et al., 2011), mentre l'esposizione alla luce solare in inverno e a latitudini più elevate determina una persistenza in ambienti acquatici maggiori di 100 giorni (Andreozzi et al., 2003; Oliveira et al., 2017); indagini di laboratorio e sul campo hanno definito un'emivita media della carbamazepina maggiore di 200 giorni, con un massimo di 1200 giorni in un lago svedese (Bu et al., 2016; Zou et al., 2015; Mezzelani et al., 2020). Nelle acque reflue sono state rilevate le più alte concentrazioni pari a 6,3 µg / L (Ternes, 1998); nei campioni di effluenti sono state misurate concentrazioni medie fino a 2,3 µg / L (Metcalf et al., 2003b). È stata trovata ubiquitaria nel fiume Elba e nei suoi affluenti (Wiegel et al., 2004) e superiore a 1 µg / L in altre acque superficiali tedesche (Ternes, 1998; Heberer, 2002; Fent et al., 2006). Dati sul bioaccumulo ci mostrano la presenza di carbamazepina nei tessuti di organismi marini come *M. galloprovincialis* nel Mar Mediterraneo (valori compresi tra 35 fino a 280 ng / g dw, Mezzelani et al., 2020), in *G. demissa* a San Francisco Bay (2.4 ng / g ww, Klosterhaus et al., 2013) e negli ecosistemi di acqua dolce, il 90% delle specie di invertebrati e vertebrati raccolte dal lago Taihu (Cina) conteneva carbamazepina con concentrazioni fino a 18 ng / g d.w. (Xie et al., 2017). Inoltre, diversi studi hanno documentato

l'insorgenza di stress ossidativo, perossidazione lipidica, compromissione del sistema immunitario e danni genotossici, in invertebrati marini esposti a un'ampia gamma di concentrazioni realistiche dal punto di vista ambientale di carbamazepina (0,3–3,0 e 6,0–9,0 $\mu\text{g} / \text{L}$) (Almeida et al., 2014, 2015, 2017; Freitas et al., 2016; Mezzelani et al., 2021). Gli stessi autori avevano anche dimostrato l'importanza di un'esposizione a lungo termine (28 giorni), evidenziando una maggiore tossicità indotta da un'esposizione cronica a carbamazepina rispetto ad un saggio acuto (Almeida et al., 2015).

Un'altra molecola di rilevanza ambientale è il valsartan (VAL): approvato per la prima volta in Europa nel 1996 per il trattamento dell'ipertensione negli adulti; nel 2016, è stato tra i primi 100 farmaci maggiormente prescritti negli Stati Uniti d'America, con oltre 8 milioni di prescrizioni (Chien et al., 2019). Il valsartan appartiene alla classe dei farmaci antagonisti dei recettori dell'Angiotensina II, detti anche "sartani"; esso interagisce con il recettore dell'angiotensina, inibendone selettivamente le azioni fisiologiche. Il sistema renina-angiotensina (RAS) svolge un ruolo importante nella regolazione della pressione sanguigna e dell'equilibrio elettrolitico; la fase finale del percorso RAS è l'attivazione del recettore dell'angiotensina II che si trova principalmente nel cuore, nei vasi sanguigni e nei reni. Bloccando l'azione del recettore, il valsartan porta alla riduzione della pressione sanguigna, inibisce il deflusso simpatico, migliora la funzione renale e diminuisce la contrazione della muscolatura liscia vascolare (Al-sarraf et al., 2014; Chien et al., 2019). Nonostante sia frequentemente rilevato nella colonna d'acqua (Gros et al., 2012; Klosterhaus et al., 2013; Moreno-Gonzalez ' et al., 2015; Pereira et al., 2015; Alygizakis et al., 2016; Mezzelani et al., 2018a; Mijangos et al., 2018) solo uno studio ha documentato il suo accumulo nell'anellide d'acqua dolce *Erpobdella octoculata*, campionati in Repubblica Ceca, con livelli fino a 2,3 ng / g (Grabicova et al., 2015; Mezzelani et al., 2020) e la sua presenza in *Mytilus galloprovincialis* campionati nel corso di 4 anni lungo le coste dei mari Adriatico e Tirrenico, con livelli fino a 7 ng/g (Mezzelani et al., 2020). I dati a disposizione sugli antipertensivi si sono concentrati sulla tossicità acuta, evidenziando l'insorgenza di effetti avversi a concentrazioni che vanno da decine a centinaia di mg / L , a seconda della specie e delle molecole. Tuttavia, siamo ormai certi del fatto che una valutazione degli effetti sub letali, legati ad esposizioni croniche, è più

idonea per caratterizzare il potenziale ecotossicologico di queste molecole costantemente presenti a basse concentrazioni (Mezzelani et al., 2018).

In riferimento a quanto detto, c'è la necessità di valutare il reale impatto di questi farmaci sugli organismi marini, in relazione alla loro diversa fisiologia e valutare gli effetti a cascata sulle reti trofiche marine. Queste, infatti, potrebbero essere direttamente influenzate dal bioaccumulo di prodotti farmaceutici o indirettamente attraverso la perdita di una specie chiave particolarmente sensibile a tali sostanze. L'impatto dei prodotti farmaceutici sui produttori primari come il fitoplancton è una preoccupazione primaria per gli ecosistemi marini, a causa dei potenziali effetti sul ciclo dei nutrienti e sulla disponibilità di cibo per altri organismi (DeLorenzo, Fleming, 2008). Allo stesso modo, i composti che alterano il sistema endocrino, condizionando la crescita e la riproduzione nei pesci, hanno il potenziale di influenzare le specie predatrici e le prede. Un ulteriore indicatore dei cambiamenti ecologici che si verificano a causa della presenza di farmaci, è il rapido sviluppo della resistenza agli antibiotici dei batteri marini, in relazione agli scarichi delle acque reflue e all'uso di antibiotici in acquacoltura (Cabello et al., 2013; Zheng et al., 2011). Ai fini della sicurezza sanitaria globale sono stati valutati i meccanismi di trasferimento di questi batteri resistenti tra le specie: sono stati riportati alti tassi di trasferimento genico orizzontale per i batteri marini. In quest'ottica il contributo dei contaminanti nell'ambiente marino all'induzione della resistenza agli antibiotici e ai percorsi per la dispersione di questi patogeni meritano ulteriori indagini (McDaniel et al., 2010; Gaw et al., 2014).

1.2 Approccio ecotossicologico integrato: bioaccumulo e biomarker

A causa del continuo uso e rilascio di prodotti farmaceutici nell'ambiente acquatico e della caratteristica di pseudo-persistenza, tali molecole possono avere capacità di bioaccumulo e causare effetti tossici in organismi non-target. A tale proposito sono state sviluppate negli ultimi anni metodologie adatte ad una visione più completa delle potenziali conseguenze. Infatti, la sola caratterizzazione chimica delle matrici abiotiche non risulta fornire informazioni adeguate sul potenziale rischio legato all'interazione dei farmaci con gli organismi marini (Chapman, 2007). Nella valutazione del rischio

ambientale per questi inquinanti emergenti è necessario un approccio multidisciplinare che combini misurazioni chimiche di farmaci ambientali in matrici abiotiche, il loro bioaccumulo in specie non-target e valutazione delle alterazioni biologiche condotte sugli organismi bioindicatori (Benedetti et al., 2012; Chapman et al., 2002; Chapman, 2007; Chapman e Hollert, 2006; Dagnino et al., 2008; Mezzelani et al., 2018a).

Il bioaccumulo è un processo in cui una sostanza chimica viene assorbita in un organismo attraverso diverse fonti di esposizione ed è il risultato netto di processi di assorbimento ed eliminazione chimica dall'organismo (Chen et al., 2021). Uno studio sulla gestione farmaceutica condotto in Svezia ha mostrato che tra i diversi prodotti farmaceutici nell'ambiente svedese, il 23% aveva un potenziale di bioaccumulo, il 92% non era biodegradabile e il 61% aveva un effetto tossico sugli organismi acquatici a una concentrazione inferiore a 1 mg/L (Wennmalm e Gunnarsson, 2009). Tenendo in considerazione la geochimica dei contaminanti e la fisiologia animale possiamo prevedere il bioaccumulo di contaminanti negli organismi acquatici e valutare il rischio legato alla presenza di varie sostanze chimiche nell'ambiente. Tra gli organismi bioindicatori, *Mytilus galloprovincialis* si è dimostrato essere un valido strumento per rilevare e caratterizzare le dinamiche di un gran numero di contaminanti nei sistemi idrici (Reichwaldt e Ghadouani, 2016), in quanto manca di meccanismi biochimici o fisiologici in grado di regolare le concentrazioni di questi composti (vengono concentrati in maniera proporzionale al loro livello ambientale). Essendo organismi filtratori, tendono ad accumulare inquinanti e sono state documentate concentrazioni di antibiotici e antidepressivi superiori di un ordine di grandezza rispetto a quelle misurate nei pesci della stessa area di campionamento (Du et al., 2014). I mitili inoltre hanno un'ampia distribuzione geografica, tollerano ampie variazioni delle condizioni ambientali, hanno un lungo ciclo di vita, che consente di monitorare il processo di bioaccumulo di molti composti durante le loro fasi di vita (Teixeira et al., 2017b) e sono facili da campionare e mantenere in condizioni controllate in laboratorio. Vivono in grandi popolazioni, formando i cosiddetti "letti di mitili" che consentono ripetuti campionamenti nella stessa area (Cristina & Gomes, 2012; Piedade et al., 2020). Inoltre, avendo un ruolo cruciale sia nella pesca commerciale che nell'acquacoltura in tutto il mondo (l'acquacoltura dei molluschi rappresenta oltre il 75%, 13,9 milioni di tonnellate dell'acquacoltura mondiale, con la produzione di mitili pari a circa il 13% (FAO, 2014) la valutazione dei residui

farmaceutici in questi organismi è rilevante anche in termini di potenziale esposizione umana, attraverso il consumo di cibo (Alvarez-Munoz et al., 2015a, b; Martinez-Morcillo et al., 2020; Mezzelani et al., 2020; Serra-Compte et al., 2017; Wille et al., 2011). Ai dati sulla biodisponibilità vengono integrati dati sulle alterazioni biologiche ai più bassi livelli dell'organizzazione biologica. Un biomarker è definito come quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individui o popolazione) la quale fornisce l'evidenza di una esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti (Hagger et al., 2006). In un contesto ambientale, i biomarker sono indicatori molto sensibili e sono spesso considerati segnali precoci di allarme poiché sono il primo target che a livello intracellulare può essere alterato dalla presenza di inquinanti chimici. Possono essere divisi in due classi:

- Biomarker di esposizione: alterazioni quantitativamente misurabili a livello molecolare, biochimico e cellulare, causate da specifiche classi di contaminanti. Questi includono variazioni di attività enzimatiche come il citocromo P450, l'acetilcolinesterasi, o cambiamenti nei livelli di metallotioneine. Viarengo *et al.*, 2007
- Biomarker di effetto: indicano l'insorgenza di alterazioni non direttamente ascrivibili ad una specifica classe di contaminanti poiché molti target cellulari possono essere colpiti da più sostanze xenobiotiche. Includono risposte immunitarie, destabilizzazione della membrana lisosomiale, danni al DNA e i parametri legati al metabolismo ossidativo.

Molti studi hanno dimostrato l'elevata sensibilità del sistema immunitario degli organismi marini nei confronti dei composti farmaceutici (Mezzelani et al., 2016; Parolini et al., 2010; Parolini et al., 2011). In particolare, nei mitili, la funzione immunitaria è principalmente svolta dagli emociti, nei quali si possono distinguere due popolazioni cellulari: i granulociti aventi una funzione fagocitaria (la cui attività riflette il grado di attivazione delle difese immunitarie stesse), e gli ialinociti, cellule indifferenziate principalmente coinvolte nei processi di coagulazione e incapsulamento (Calisi et al., 2008, Gorbi et al., 2013). Variazioni nella capacità di fagocitosi e nel rapporto granulociti-ialinociti sono state osservate nel mitilo Mediterraneo *Mytilus galloprovincialis* esposto in condizioni di laboratorio a concentrazioni ambientalmente realistiche di farmaci

antiinfiammatori non steroidei e antiepilettici (Mezzelani et al., 2018b, 2021). I lisosomi sono la componente subcellulare maggiormente coinvolta nella risposta immunitaria per contrastare eventuali effetti avversi indotti dai contaminanti ambientali. Un ruolo fondamentale è quello di degradare le macromolecole esogene e riciclare le sostanze organiche cellulari. Quando i lisosomi presentano un sovraccarico di prodotti di degradazione (IPA, metalli, farmaci, pesticidi, etc.), possono verificarsi alterazioni strutturali a carico della membrana lisosomiale; lo studio di queste modificazioni ci può fornire una conferma dell'alterazione dello stato di salute dell'organismo ed ha un alto valore predittivo sull'insorgenza di effetti ecotossicologici più gravi (Moore and Allen, 2002). Ad esempio, l'esposizione di *Dreissena polymorpha* a livelli ambientalmente realistici di paracetamolo (0,75-1,51 µg/L) e ibuprofene (2-8 µg/L) ha evidenziato un decremento significativo della stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti, sottolineando l'estrema sensibilità di questo parametro nel rilevare l'esposizione a stress ambientali. Inoltre, un'ampia letteratura (Akcha et al., 2004, Fasulo et al., 2010, Frenzilli et al., 2004, Steinert et al., 1998) stabilisce la correlazione positiva tra presenza di mutageni ambientali e danno al DNA, confermando come il saggio dei micronuclei possa essere uno strumento utile a determinare la potenziale genotossicità degli inquinanti dell'acqua (Tomasello et al., 2012). In un esperimento sul mitilo d'acqua dolce *Dreissena polymorpha*, le analisi condotte sugli emociti hanno rilevato un aumento del danno genotossico in termini di frammentazione del DNA e presenza di cellule apoptotiche a seguito dell'esposizione a varie dosi di paracetamolo (30-450 µg/L), diclofenac (60-250 µg/L) e ibuprofene (450-909 µg/L); variazioni più limitate degli stessi parametri sono state riportate dopo l'esposizione a concentrazioni più basse (Parolini et al., 2010; Parolini et al., 2011),

I contaminanti organici, ancora, sono spesso in grado di aumentare i livelli cellulari delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso l'alterazione dell'attività di alcuni enzimi coinvolti nella risposta detossificante, diminuendo così le difese immunitarie dell'organismo (Regoli et al., 2002; Parolini et al., 2011), come dimostrato in vari studi riportati in bibliografia che confermano l'insorgenza di fenomeni di stress ossidativo a seguito di esposizione di bivalvi a paracetamolo (Parolini et al., 2010), ibuprofene (Gonzales-Rey and Bebianno, 2011; Parolini et al., 2011; Gonzales Rey and Bebianno, 2012) e diclofenac (Quinn et al., 2011).

Il ruolo dei biomarker nelle indagini ecotossicologiche non è quindi di dare informazioni “quantitative” sui livelli di esposizione di un organismo ad un determinato contaminante, ma quello di fornire indicazioni sullo stato di salute come segnale potenziale di alterazioni ai più alti livelli ecologici (Peakall and Shugart, 1993).

2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni, la presenza di farmaci negli ecosistemi acquatici è stata riconosciuta come un problema ambientale cruciale (Mezzelani et al., 2018a). L'incremento nell'utilizzo di queste sostanze e il continuo rilascio, in assenza di normative specifiche finalizzate alla regolamentazione delle loro concentrazioni negli ambienti naturali, hanno permesso di definire questi contaminanti come "pseudo-persistenti", potenzialmente pericolosi per gli organismi acquatici, costantemente esposti a queste molecole nel corso del loro intero ciclo vitale (Bebianno and Gonzalez-Rey, 2015). Inoltre, negli ecosistemi acquatici i farmaci non sono presenti come composti isolati, ma sottoforma di miscele complesse, tuttavia lo studio di potenziali effetti additivi, sinergici o antagonisti è stato finora poco indagato pur rappresentando un aspetto fondamentale per la comprensione del rischio di queste sostanze negli ambienti marini.

Date queste premesse l'obiettivo del mio lavoro di tesi è stato quello di indagare i potenziali meccanismi di interazione di più composti farmaceutici applicando un approccio ecotossicologico integrato che comprende sia l'analisi del bioaccumulo delle molecole testate sia lo studio dell'insorgenza di alterazioni biochimiche e cellulari indotte dalle stesse. A questo scopo l'organismo bioindicatore *Mytilus galloprovincialis* è stato esposto in condizioni di laboratorio ai composti farmaceutici Carbamazepina (CBZ) e Valsartan (VAL), ad una concentrazione ambientalmente realistica (0.5µg/L), sia singolarmente che sottoforma di miscela binaria (CBZ 0.5µg/L+VAL 0.5µg/L) per 14 giorni. Alla fase di esposizione è seguita una fase di depurazione mirata a valutare la capacità di recupero degli organismi dopo 14 giorni di mantenimento in acqua priva dei farmaci testati. I biomarker selezionati includono i parametri di risposte lisosomiali e immunologiche, metabolismo ossidativo e perossidazione lipidica, danno genotossico e proliferazione perossisomiale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Piano sperimentale

I mitili (*Mytilus galloprovincialis*, 6 ± 1 cm) sono stati prelevati da un allevamento locale, acclimatati negli acquari contenenti acqua di mare artificiale (salinità 35‰, temperatura 18°C) per 10 giorni e successivamente esposti per 14 giorni alle seguenti condizioni sperimentali: CTL: controllo; CBZ: 0.5 µg/L carbamazepina; VAL: 0.5µg/L valsartan; CBZ + VAL: 0.5µg/L CBZ+ 0.5µg/L VAL. Ogni 48 ore sono stati effettuati i cambi di acqua e il ri-dosaggio dei composti farmaceutici. Le dosi di esposizione selezionate per CBZ e VAL sono ambientalmente realistiche e comunemente misurate in aree marino-costiere. Al termine della fase di esposizione, è iniziata una fase di depurazione (14 giorni) nel corso della quale gli organismi sono stati mantenuti in acqua pulita (priva di CBZ e VAL), alle stesse condizioni degli organismi di controllo. I campioni di mitili per le analisi chimiche delle concentrazioni tissutali di CBZ e VAL finalizzate a valutare il bioaccumulo e l'escrezione sono stati prelevati a giorno: 0, 7, 14, e 28 mentre quelli per le analisi delle alterazioni molecolari, biochimiche e cellulari sono stati prelevati al termine delle fasi di esposizione e di escrezione: rispettivamente a giorno 14 e 28. Per le analisi chimiche, 3 pool costituiti da 5 organismi ciascuno, sono stati dissezionati e congelati a -20°C. Per le analisi delle risposte immunitarie, enzimatiche e della capacità antiossidante totale, 5 pool di emolinfa e di ghiandola digestiva sono stati ottenuti da 15 organismi. L'emolinfa è stata prelevata dal muscolo adduttore, in parte direttamente congelata in azoto liquido e mantenuta a -80°C per l'analisi dell'attività dell'acetilcolinesterasi e in parte immediatamente processata per le analisi dei parametri emocitari (rapporto granulociti/ialinociti, attività di fagocitosi e stabilità delle membrane lisosomiali) e del danno genotossico (test della cometa e frequenza dei micronuclei). Le ghiandole digestive sono state dissezionate e congelate a -80°C fino al momento delle analisi.

3.2 Metodologie per le analisi chimiche

Tutti gli standard analitici dei composti farmaceutici che sono stati utilizzati per le analisi sono stati acquistati con un elevato grado di purezza (superiore al 95%), in modo da garantire compatibilità con le metodiche sviluppate; le molecole utilizzate sono state ottenute da Sigma-Aldrich, e nello specifico sono: carbamazepina (CBZ) e valsartan (VAL). I tessuti di mitilo sono stati analizzati al fine di valutare il bioaccumulo dei farmaci tramite la tecnica della cromatografia liquida ad alta prestazione (High Performance Liquid Chromatography o HPLC), utilizzando uno strumento del tipo Agilent Infinity della serie 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), composto da una pompa quaternaria, un autocampionatore, un detector a serie di diodi (diode array, DAD) ed un detector in fluorescenza. Per ogni tipologia di farmaco sono state validate condizioni ottimali che hanno determinato la necessità di sviluppare due differenti metodi cromatografici (Mezzelani et al., 2020). Al momento delle analisi i campioni sono stati scongelati: da essi sono stati prelevati circa 3g di tessuto che sono stati omogenati tramite l'uso dell'ultra turrax (IKA ULTRA® TURRAX® Tube Dispenser) per 20 minuti a temperatura ambiente, previa l'aggiunta di 5mL di un apposito buffer di estrazione; il buffer per la preparazione è composto da acido acetico allo 0,1% diluito in acqua ultra pura (pH = 3.6). La frazione liquida così ottenuta è stata centrifugata per 30 minuti a 4500 × g i campioni sono stati successivamente purificati mediante la tecnica di estrazione di fase solida (Solid Phase Extraction o SPE), utilizzando delle cartucce apposite (Discovery DSC-18; 1g x 6 ml; Supelco; Bellefonte, USA). Prima di procedere con la purificazione dei campioni utilizzati per la determinazione degli analiti le cartucce sono state condizionate utilizzando, in successione, 6 ml di metanolo e 18 ml di acqua ultra pura; successivamente, i 5 ml di campione sono stati caricati nella cartuccia insieme a 5 ml di acqua per ottenere una diluizione del campione al 50%; infine, alle cartucce è stato fatto un lavaggio finale con 12 ml bicarbonato di potassio KHCO₃ e 6 ml di acqua ultra-pura, questo per poi eluire i campioni utilizzando 2 ml di metanolo con acido acetico allo 0.1%. Le frazioni così ottenute sono state trattate utilizzando i filtri Phenex™-RC (struttura in polipropilene e dischetto in cellulosa rigenerata con diametro di 15 mm e pori di 0,45 µm; Phenomenex, USA).

Il successivo passaggio ha previsto una centrifugazione a $12000 \times g$ per 20 minuti. I campioni ottenuti sono stati inseriti nelle vials per la successiva analisi tramite HPLC e detezione tramite fluorimetro e diode-array-detector (DAD). Per la separazione cromatografica è stata utilizzata la colonna Kinetex (C18, particelle della resina interna del diametro di 5 μm , 150 mm di lunghezza, 4,6 mm di diametro interno, Phenomenex, USA). I diversi analiti sono stati identificati mediante il proprio tempo di ritenzione, determinato grazie all'utilizzo di apposite soluzioni di standard puri, che sono stati anche utilizzati al fine di ottenere le rette di calibrazione mediante diluizioni seriali a concentrazione nota. I campioni contenuti nelle vials sono stati introdotti in colonna tramite una fase mobile composta da diversi solventi: 26% di acqua, 42% di acetonitrile, acido acetico allo 0,01% (pH = 3,6), in condizioni isocratiche. Il DAD è stato utilizzato per rilevare nello spettro compreso tra 190 nm e 350 nm la presenza di CBZ a 248 nm. Questa lunghezza d'onda è stata scelta in modo da rilevare almeno l'85% dell'assorbanza totale della molecola testata. In corrispondenza del segnale di emissione, è stata verificata l'assenza di sostanze interferenti. Sono stati stabiliti due segnali qualificatori corrispondenti ad almeno il 50-75% dell'assorbanza totale, al fine di confermare l'identità del composto. La detezione di VAL, invece, è stata effettuata utilizzando il fluorimetro, andando ad utilizzare delle coppie di lunghezza d'onda di eccitazione/emissione di 205/380 nm. Anche in questo caso sono stati utilizzati dei segnali qualificatori. La concentrazione dei farmaci è stata ricavata confrontando il segnale ottenuto con quello emesso dalla corrispondente soluzione pura standard. La verifica della metodica è stata eseguita tramite numerose prove su diversi omogenati di mitilo ai quali sono stati aggiunti i principi attivi da testare; a causa della mancanza di appropriati Standard Materiali di Riferimento Certificati, la resa di ciascun composto è stata stimata utilizzando dei campioni di mitili di controllo (effettuando 10 repliche) iniettati con differenti concentrazioni di molecole ricercate. Il valore minimo del range lavorativo ottimale corrisponde al limite analitico di misurazione il quale garantisce una accettabile variabilità ($CV < 20\%$) su 10 repliche e una buona linearità ($R^2 > 0.99$), mentre il massimo valore assicura almeno il 95% delle repliche ($n = 10$). Considerando queste condizioni analitiche e le procedure di preparazione descritte prima, i quantitativi minimi misurabili (Limit of Detection, LOD) nei tessuti dei mitili sono stati fissati a 1.0 ng/g p.s. per CBZ e 0.5 ng/g p.s. per VAL. Tutti questi valori assicurano sempre una accuratezza

analitica adeguata. Durante la validazione dei protocolli, i campioni addizionati con dei livelli di farmaci appartenenti al range del disegno sperimentale, hanno sempre fornito una significativa riproducibilità dei risultati con una bassa variabilità ($CV < 5\%$, $n = 10$) e una elevata percentuale di resa (superiore al 98%). La concentrazione finale nei tessuti dei mitili è stata espressa in ng/g di tessuto secco (p.s.).

3.3 Metodologie per le analisi biologiche

I principali biomarkers (risposte biologiche) che sono stati indagati nei mitili esposti includono parametri di risposta immunitaria e lisosomiale, risposte istopatologiche, marker di proliferazione perossisomiale e di neurotossicità, parametri di disturbo ossidativo, marker di danno genotossico. Tali parametri sono stati indagati attraverso l'applicazione di tecniche spettrofotometriche, spettrofluorimetriche, gascromatografiche e di microscopia ottica e a fluorescenza, secondo protocolli già validati e ampiamente utilizzati in studi di ecotossicologia (Mezzelani et al., 2021).

Stabilità delle membrane lisosomiali

Questo parametro viene misurato attraverso la misurazione del tempo di ritenzione del Rosso Neutro (Gorbi et al., 2008). Nel *Mytilus galloprovincialis* si preleva un'aliquota di emolinfa con una siringa contenente un volume uguale di soluzione fisiologica. Di questa soluzione si prelevano 50 μ L e si strisciano su un vetrino e si lasciano aderire le cellule per 15 minuti a 4 °C in camera buia e umida. Le cellule vengono incubate con una soluzione di Rosso Neutro (2 μ l/ml di acqua di mare filtrata preparata a partire da una soluzione madre di 20 mg di colorante Rosso Neutro disciolto in 1 ml di DMSO) ed esaminate ad intervalli di tempo di 15 minuti (per un tempo massimo di 120 minuti) per determinare il tempo al quale il 50 % degli emociti presenta il Rosso Neutro non più all'interno dei lisosomi ma nel citosol.

Analisi del rapporto Granulociti-Ialinociti

Per l'analisi del rapporto Granulociti-Ialinociti aliquote di emolinfa sono state disperse su vetrino e, dopo asciugatura, le cellule adese sono state fissate in Baker's Ca-formolo (10 mL di Formaldeide al 40%; 1 g di CaCl₂, NaCl al 2.5%, portato a volume con acqua distillata). I vetrini dopo essere stati risciacquati sono stati colorati con Gimsa, prima di essere montati in gelatina di glicerolo. L'osservazione effettuata in microscopia ottica

(1000x) permette di valutare il numero di granulociti e ialinociti, contando almeno 200 cellule per ogni campione.

Analisi della capacità di fagocitosi

Per l'analisi della capacità di fagocitosi circa 100 µl di emolinfa viene dispersa su vetrino e le cellule vengono fatte aderire per 15 minuti in camera umida e al buio. Biopartecelle di ZIMOSAN A (lieviti *Saccaromices cerevisiae*) marcate con fluoresceina (Invitrogen Z2841) vengono aggiunte in modo da ottenere un rapporto di circa 10:1 (bioparticelle: emociti). Dopo due ore di incubazione in camera umida e al buio, le particelle non fagocitate vengono rimosse attraverso un lavaggio in soluzione fisiologica e i vetrini fissati in Baker's Ca-formolo e montati in gelatina di glicerolo. L'attività di fagocitosi viene espressa come percentuale di cellule che internalizzano almeno 3 particelle fluorescenti, dopo aver osservato al microscopio a fluorescenza almeno 200 cellule per ogni campione.

Proliferazione perossisomiale

L'analisi della proliferazione perossisomiale rappresenta un biomarkers che può essere correlato all'esposizione ad alcune sostanze dette proliferatori perossisomiali compresi alcuni contaminanti organici come idrocarburi policiclici aromatici (IPA) o composti policlorobifenili (PCB) (Cajaraville et al., 2003) (Cancio et al., 2000). In laboratorio, per misurare i livelli di proliferazione perossisomiale viene effettuato un saggio enzimatico che misura l'attività dell'acil CoA ossidasi (AOX), enzima coinvolto nella β ossidazione degli acidi grassi. Il metodo prevede la preparazione di un omogenato del campione con un tampone sodio bicarbonato 1 mM pH 7.6 e centrifugato a 500 x g per 15 minuti. L'attività enzimatica dell'ACOX viene determinata seguendo la reazione di ossidazione della diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) con l'aggiunta di una perossidasi esterna e di un substrato specifico il Palmitoil CoA. Temperatura del saggio 25°C e $\lambda=502$ nm (Small et al., 1985).

Attività dell'acetilcolinesterasi

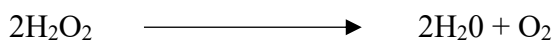
L'acetilcolinesterasi è un enzima che catalizza la reazione di idrolisi dell'acetilcolina scissa in colina e gruppo acetato. Dal punto di vista fisiologico è una reazione molto importante perché implicata nella trasmissione dell'impulso nervoso nel sistema volontario. L'acetilcolina è un neurotrasmettitore che a livello delle sinapsi si lega ai recettori trasmettendo così l'impulso nervoso. Quando questo termina, l'eccesso di acetilcolina a livello delle sinapsi deve essere eliminato proprio mediante l'azione dell'acetilcolinesterasi.

Nei mitili l'attività di questo enzima viene misurata in campioni di emolinfa centrifugati per 5 minuti a 3000 x g. Il sovrinatante viene utilizzato per determinare l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) con il metodo di Ellman che prevede la reazione dell'acetilcolina con il DTNB (acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico) alla temperatura di $18 \pm 1^\circ\text{C}$, alla lunghezza d'onda di 412 nm, con $\epsilon=13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Gorbi et al., 2008).

Analisi dei sistemi antiossidanti

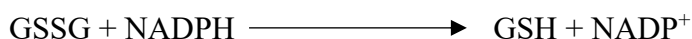
L'analisi dei sistemi enzimatici antiossidanti è stata effettuata su campioni di ghiandola digestiva omogenati (1:5 p/v) in un tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, con NaCl 2.5%, PMSF (fenilmetilsolfonilfluoruro) 0.1 mM e inibitori di proteasi: aprotinina 0.008 TIU/mL, leupeptina 1 $\mu\text{g/mL}$, pepstatina 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Dopo centrifugazione a 100.000 xg per 1 ora a 4°C , la frazione citosolica è stata aliquotata e conservata a -80°C . Le attività enzimatiche dei principali sistemi antiossidanti sono state analizzate attraverso saggi spettrofotometrici a 18°C .

La catalasi (CAT) è un enzima che catalizza la seguente reazione



e il suo ruolo è quello di detossificare il perossido di idrogeno trasformandolo in acqua e ossigeno. La sua attività è stata valutata seguendo la diminuzione di assorbanza a $\lambda=240 \text{ nm}$, $\epsilon=-0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Il saggio è condotto per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7, con H_2O_2 12 mM ed opportune aliquote di campione.

L'enzima glutatione reduttasi (GR), responsabile della trasformazione del glutatione ossidato GSSG nella forma ridotta GSH tramite l'utilizzo di NADPH, viene saggiato mediante l'analisi del decremento di assorbanza rilevata a $\lambda=340$ nm, $\epsilon=-6.22$ mM⁻¹cm⁻¹, dovuta all'ossidazione del NADPH. La reazione viene effettuata in un volume di saggio finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7, GSSG 1 mM, NADPH 0,12 mM ed opportune aliquote di campione.



L'attività delle Glutatione S-transferasi (GST) è misurata usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) come substrato (Gorbi et al., 2008). L'analisi è stata condotta tramite saggio spettrofotometrico seguendo l'andamento dell'assorbanza del complesso formatosi da GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) rilevata a $\lambda=340$ nm, $\epsilon=-9.6$ mM⁻¹cm⁻¹. La reazione è seguita per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM pH 6,5, CDNB 1,5 mM, GSH 1 mM ed opportune aliquote di campione.

Le Glutatione Perossidasi (GPx) agisce sui perossidi inorganici trasformandoli nel loro alcol corrispondente. La loro attività enzimatica è misurata seguendo l'azione di un sistema di enzimi accoppiati dove il GSSG formato nella reazione delle perossidasi viene convertito nella forma ridotta GSH dalla glutatione reduttasi a costo del NADPH. Il consumo di NADPH è misurato mediante la diminuzione dell'assorbanza a $\lambda=340$ nm. L'attività delle forme enzimatiche Se-dipendenti e dell'insieme di quelle Se-dipendenti e Se-indipendenti è stata misurata usando come substrato il perossido di idrogeno per verificare l'efficacia di detossificazione degli enzimi perossidi inorganici, e l'idroperossido di cumene per verificare l'efficacia di detossificazione degli enzimi perossidi organici. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7,5, EDTA 1 mM, GSH 2 mM, NADPH 0,24 mM, 0,5 mM H₂O₂ o 0,8 mM CuPx, 1U GR ed opportune aliquote di campione.

Il glutatione totale (GSH) viene saggiato in laboratorio seguendo la reazione catalizzata dalla glutatione reduttasi (GR) del GSH con il DTNB e comparando questo tasso di conversione con una curva standard di GSH (Gorbi et al., 2008). Gli omogenati di

ghiandola digestiva sono stati preparati in acido sulfosalicilico 5% con EDTA 4 mM (1:5 p/v). I campioni sono stati lasciati in ghiaccio per 45 minuti per la deproteinizzazione, poi centrifugati a 37.000 x g per 15 minuti. Il glutatione totale è stato determinato nel sovrinatante misurando per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda $\lambda=412$ nm, l'intensità di reazione tra i gruppi -SH e DTNB. Il saggio è stato condotto in tampone K-fosfato 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTNB 0,1 mM, NADPH 0,24 mM, glutatione riduttasi 1 U ed opportune aliquote di campione. I valori di assorbanza ottenuti sono stati quantificati mediante una curva di calibrazione standard a concentrazioni note di glutatione ridotto.

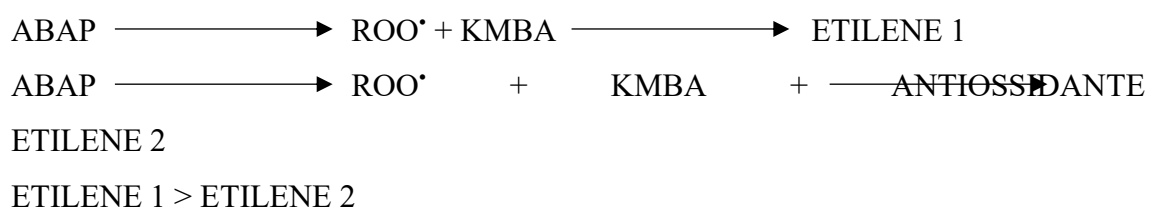
Analisi della capacità antiossidante totale (TOSC)

La capacità antiossidante totale permette di misurare la capacità complessiva degli antiossidanti cellulari di assorbire differenti forme di radicali generati artificialmente (radicale perossilico ROO[•], radicale idrossilico •OH) (Gorbi et al., 2008).

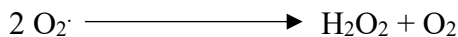
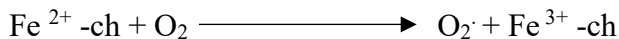
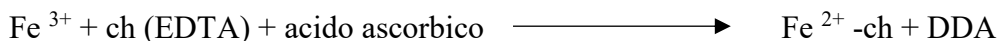
Nel saggio per i radicali perossilici, all'interno delle vials vengono iniettati il generatore di radicali ABAP (radicale perossilico), KMBA (substrato), e l'antiossidante.

Le analisi sono state effettuate sulla componente citosolica dei campioni di ghiandola digestiva omogenati (1:5 p/v) in un working-buffer costituito da tampone K-fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 2.5%. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 100000 xg per 1 ora e 10 minuti a 4°C, e la frazione citosolica subaliquotata e conservata a - 80°C fino al momento delle analisi. Il saggio TOSCA (Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay) prevede la reazione tra le diverse forme di radicali che sono artificialmente generati, e l'acido α -cheto- γ -metiolbutirrico (KMBA), che funge da substrato e si ossida liberando gas etilene. La produzione di etilene risulta quantitativamente diminuita in presenza di agenti antiossidanti (come quelli contenuti nel materiale biologico) che reagiscono con i radicali neutralizzandoli e sottraendoli alla reazione con il KMBA.

I radicali perossilici (ROO[•]) sono stati generati attraverso l'omolisi termica del 2,2'-azo-bis-amidinopropano (ABAP)



mentre i radicali idrossilici (HO•) attraverso la reazione di Fenton ferro-ascorbato.



Le reazioni sono state condotte in appositi contenitori di vetro da 10 ml (vials), sigillati con speciali tappi muniti di setto, mantenuti alla temperatura costante di 35°C in bagno termostatico continuamente agitato per consentire una generazione costante delle varie forme di radicali. Le condizioni finali di saggio sono state le seguenti:

- per l'analisi con i radicali perossilici (ROO•): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM e ABAP 20 mM in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4;
- per l'analisi con i radicali idrossilici (•OH): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM, Fe³⁺ 1.8 µM, EDTA 3.6 µM e acido ascorbico 180 µM in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4.

Il KMBA viene ossidato dalle diverse forme di radicali generando gas etilene. La formazione dell'etilene è stata monitorata nel tempo mediante analisi gas-cromatografica su colonna.

La quantificazione del gas prodotto viene effettuata tramite gascromatografo. La differenza di produzione di etilene tra le vials contenenti il campione e quelle senza campione viene calcolata matematicamente integrando l'area al di sotto della rispettiva curva in funzione del tempo, considerando che ogni campione viene letto ogni 12 minuti per un tempo totale di saggio pari a 96 minuti. I risultati ottenuti permettono di quantificare il parametro TOSC, compreso tra 0 e 100, indice della capacità complessiva del campione analizzato, di neutralizzare le varie forme di specie reattive dell'ossigeno. Il valore TOSC sperimentale è ottenuto secondo la formula:

$$\text{TOSC} = 100 - \left(\int \text{SA} / \int \text{CA} \times 100 \right)$$

Dove $\int \text{SA}$ e $\int \text{CA}$ sono gli integrali delle aree al di sotto delle curve che rappresentano le reazioni del campione (SA) che contiene anche l'antiossidante, e del controllo (CA) che invece contiene il KMBA e il generatore di radicali.

Per cui un campione con valore TOSC vicino a 0 sarà molto simile al controllo per cui avrà una bassa attività antiossidante. Al contrario un valore TOSC vicino a 100 mostrerà un'alta capacità antiossidante del campione.

I valori TOSC vengono rapportati al contenuto proteico ed espressi come unità TOSC /mg di proteine.

Valutazione del danno genotossico

Il danno genotossico è stato misurato mediante l'analisi della frequenza dei micronuclei. La frequenza di micronuclei (MN) viene valutata negli emociti prelevati dal muscolo adduttore, lavati in un buffer salino (500 mM NaCl, 120 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM EDTA) con brevi centrifugate. Le cellule vengono poi trattate con fissativo di Carnoy (miscela 3:1 metanolo ed acido acetico) e sottoposte ulteriormente a brevi centrifugate e cambi di fissativo, prima di allestire degli strisci su vetrino. Dopo colorazione dei preparati con 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) 100 ng mL⁻¹, i vetrini vengono esaminati al microscopio in fluorescenza per determinare la percentuale delle cellule contenenti micronuclei. Per ciascun campione sono vengono contate almeno 2000 cellule, considerando micronuclei tutte quelle porzioni di cromatina fortemente DAPI positive in discontinuità fisica con il nucleo centrale, di forma circolare od ovoidale e di diametro compreso tra 1/3 e 1/20 del diametro del nucleo della cellula.

4. RISULTATI

I risultati di bioaccumulo di CBZ e VAL negli organismi di controllo e in quelli esposti alle condizioni sperimentali sono riportati nelle figure 4A e 4B. In figura 4A, negli organismi di controllo, si osservano livelli misurabili di CBZ al giorno 0 pari a $36,99 \pm 6,11$ ng/g peso secco (p.s.); questi livelli tendono tuttavia a diminuire e a raggiungere valori al di sotto del limite di detezione (LOD) dopo 7 giorni di esposizione. Nei mitili esposti a CBZ (CBZ e CBZ+VAL) si osserva un marcato aumento della concentrazione tissutale di questa molecola rispetto agli organismi di controllo sia a giorno 7 che a giorno 14 con livelli più alti nei mitili esposti alla molecola singola ($109,26 \pm 53,67$ ng/g p.s. e $95,21 \pm 31,81$ ng/g p.s. rispettivamente a giorno 7 e 14), rispetto agli organismi esposti alla miscela binaria ($32,93 \pm 9,8$ ng/g p.s. e $23,13 \pm 0,96$ ng/g p.s. rispettivamente a giorno 7 e 14).

In figura 4B vengono riportati i dati sul bioaccumulo del VAL; gli organismi di controllo mostrano valori inferiori al LOD, mentre nei mitili esposti a VAL e CBZ+VAL rileviamo il bioaccumulo della molecola, ma senza differenze significative tra il dosaggio singolo ($1,54 \pm 0,55$ ng/g p.s. e $0,48 \pm 0,09$ ng/g p.s. rispettivamente a giorno 7 e 14), e quello combinato, ($1,07 \pm 0,26$ ng/g p.s. e $0,98 \pm 0,32$ ng/g p.s. rispettivamente a giorno 7 e 14). Al termine del periodo di depurazione tutti gli organismi esposti evidenziano valori di CBZ e VAL al di sotto del LOD.

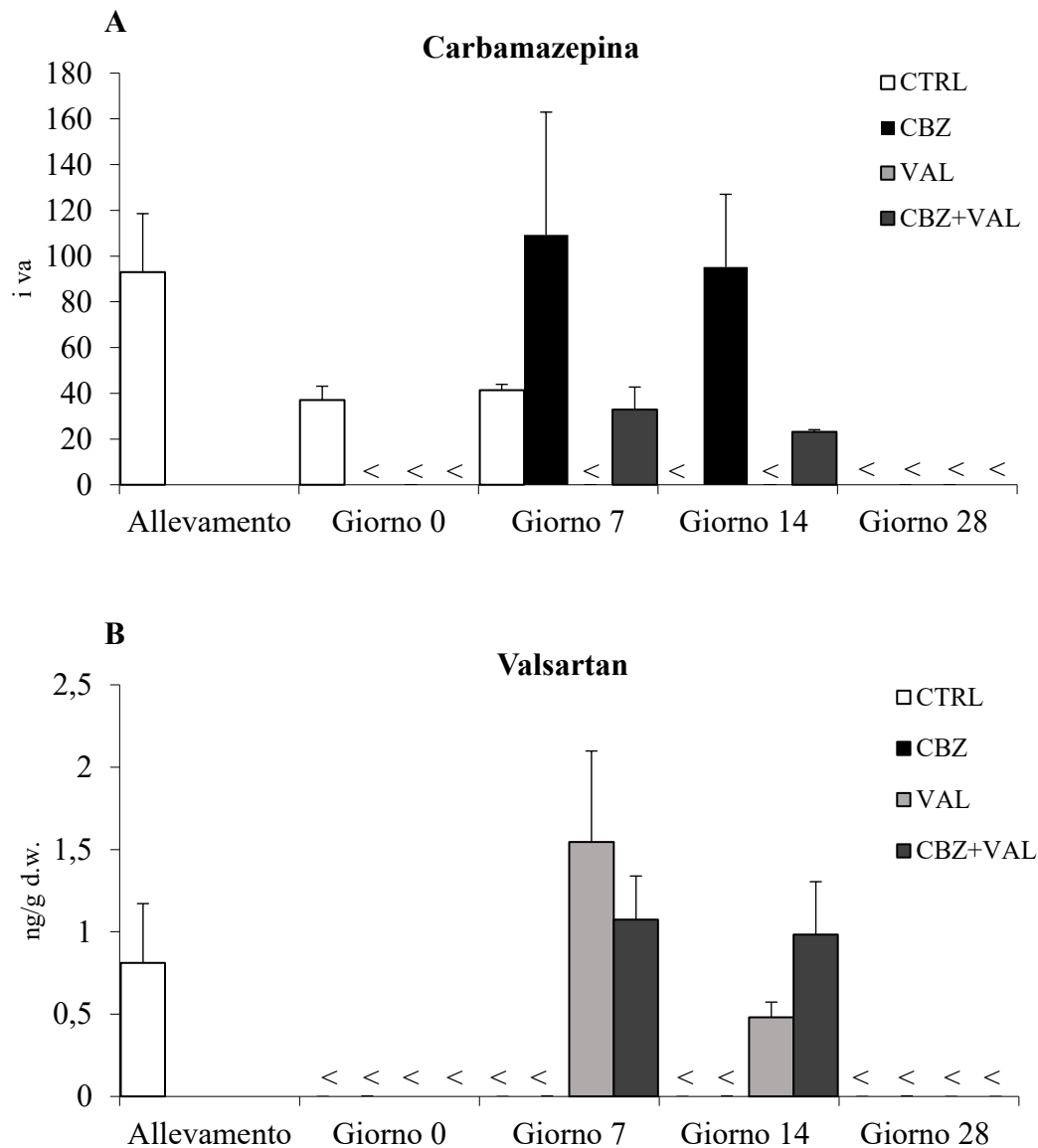


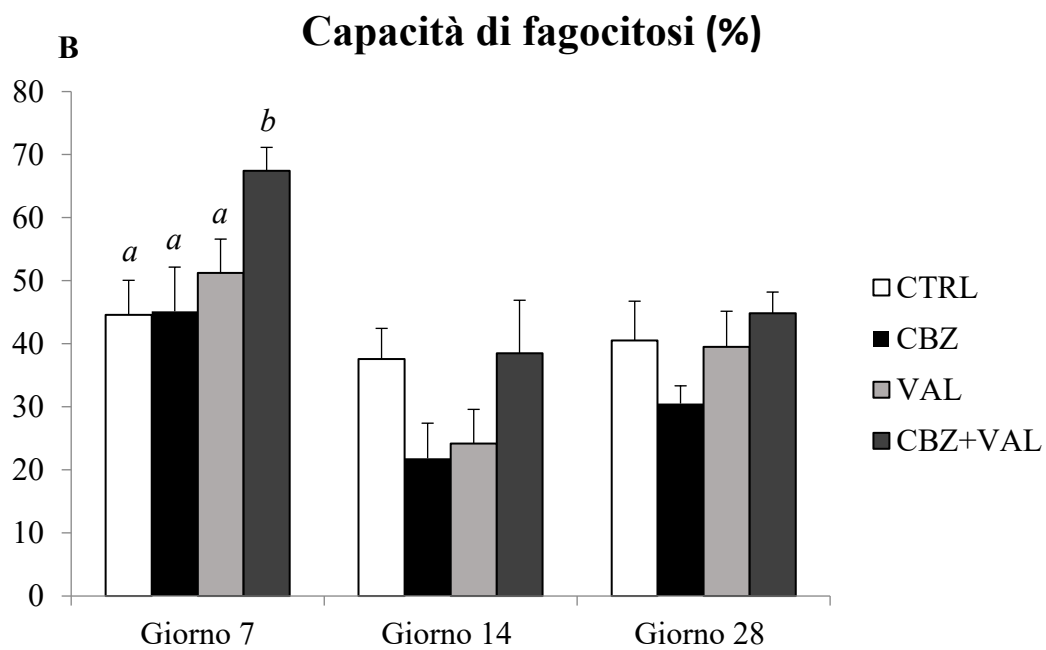
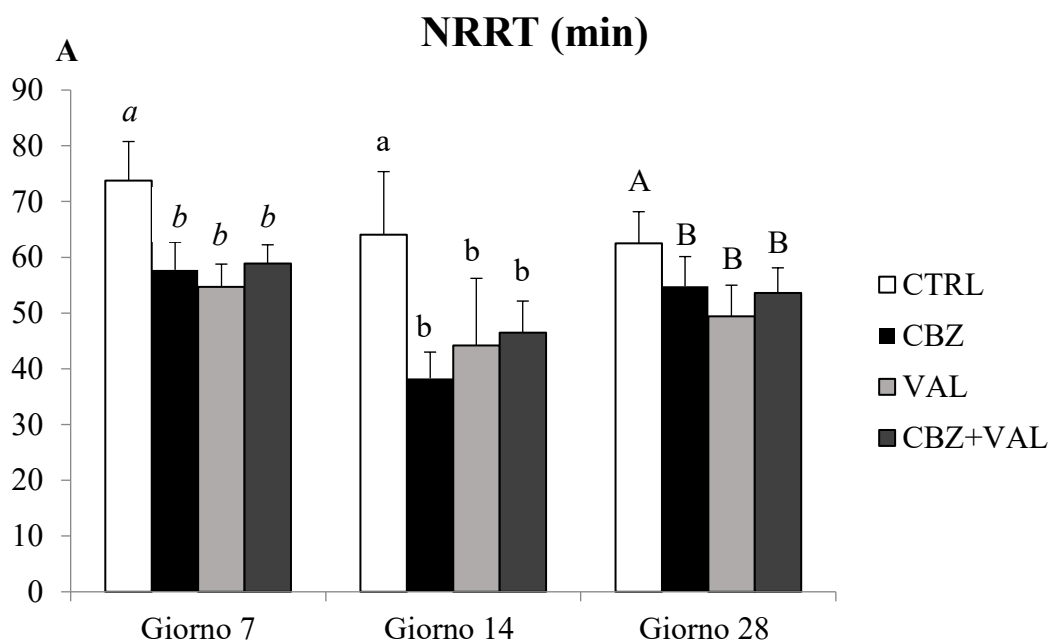
Figura 4. Concentrazione dei farmaci rilevati nei tessuti molli di Mytilus galloprovincialis. 4A) Concentrazione di CBZ rilevata negli organismi esposti; 4B) concentrazione di VAL rilevata negli organismi esposti. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard, dev.st. dei valori di concentrazione ng/g peso secco (p.s.). “<” indica concentrazioni inferiori al limite di detezione (LOD).

La stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti dei mitili è significativamente diminuita in tutti gli organismi esposti rispetto a quelli di controllo a giorno 7, 14 e 28, senza differenze significative tra i vari trattamenti (Fig. 5A).

Per quanto riguarda gli altri parametri legati alla risposta immunitaria, dopo 7 giorni di esposizione si osserva un aumento significativo della capacità di fagocitosi negli organismi co-esposti (CBZ+VAL), mentre a giorno 14 negli organismi trattati singolarmente con CBZ e VAL si misura una capacità di fagocitosi più bassa; queste differenze non sono statisticamente significative e queste limitate variazioni si mantengono anche dopo il periodo di depurazione (figura 5B).

Il trend di variazione del rapporto granulociti/ialinociti è caratterizzato da un andamento bifasico: al giorno 7, risulta essere maggiore in tutti gli organismi esposti rispetto al controllo, con valori statisticamente significativi nei mitili trattati con VAL. Tali variazioni non si osservano al giorno 14, mentre nella fase di depurazione si registra un aumento statisticamente significativo in tutti gli organismi trattati, particolarmente evidente per gli organismi esposti a CBZ (figura 5C).

Gli effetti genotossici sono stati analizzati come comparsa di micronuclei (MN); al giorno 7 si rileva un leggero aumento nella frequenza per gli organismi esposti a CBZ, tuttavia questi valori non sono statisticamente significativi. Al giorno 14 si ha un aumento statisticamente significativo della frequenza di micronuclei negli organismi esposti a VAL, mentre gli altri organismi trattati (CBZ e CBZ+VAL) mostrano valori che non si discostano da quelli degli organismi di controllo. Dopo 28 giorni, non si misurano differenze significative tra i vari trattamenti (figura 5D).



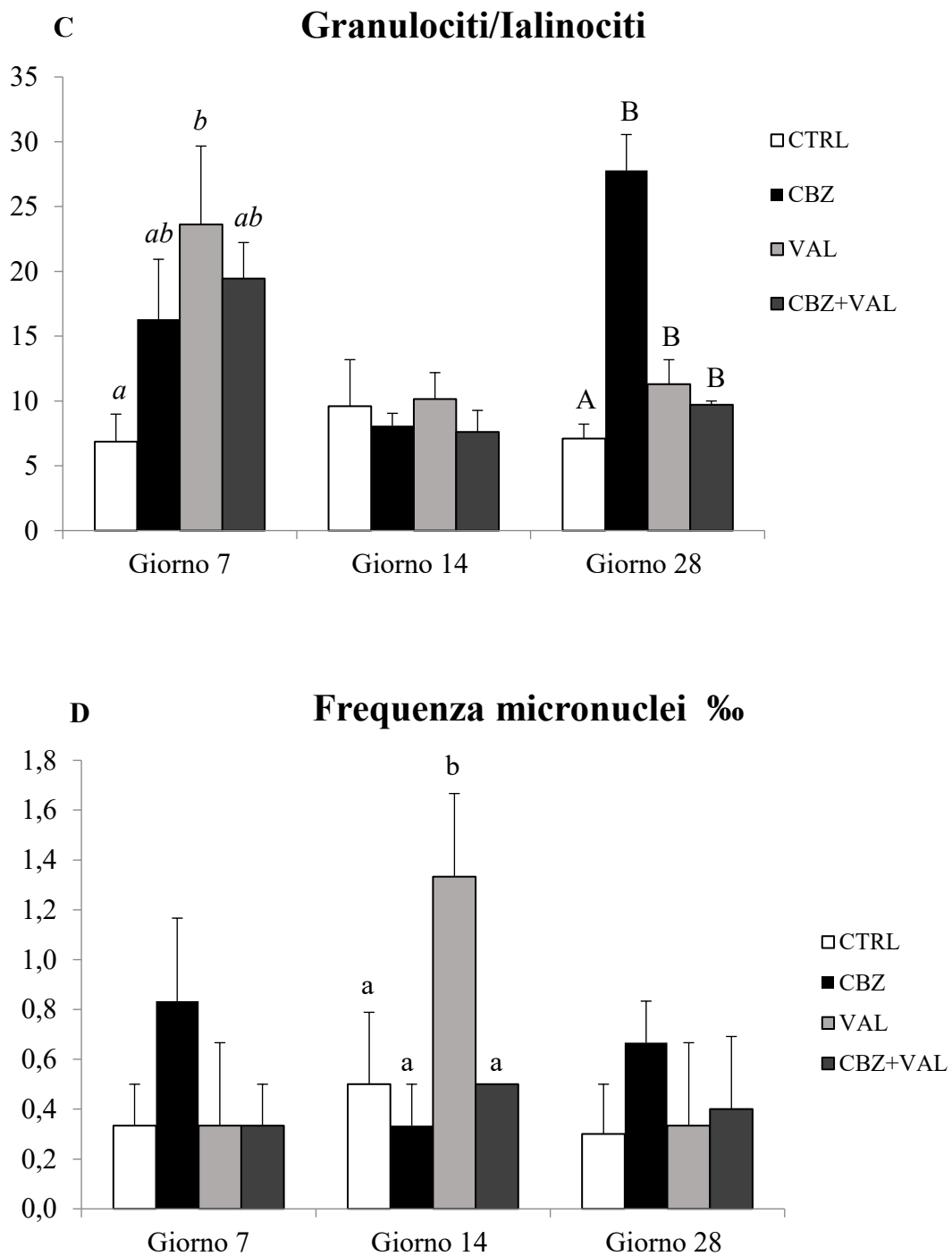


Figura 5. 5A) Tempo di ritenzione del rosso neutro; 5B) Capacità di fagocitosi; 5C) Rapporto granulociti/ialinociti; 5D) Frequenza micronuclei. I dati sono espressi come media \pm dev.st. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi di medie. Le lettere in corsivo minuscolo identificano le differenze tra i trattamenti a giorno 7, le lettere in minuscolo e le lettere in maiuscolo indicano le differenze tra i trattamenti rispettivamente a giorno 14 e 28.

L'attività dell'Acil-CoA ossidasi (ACOX) risulta essere significativamente indotta negli organismi singolarmente esposti a VAL a giorno 14, mentre a giorno 28 non si misurano differenze significative (figura 6A).

L'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) (figura 6B) mostra un'induzione statisticamente significativa al giorno 14 negli organismi esposti al VAL; negli esposti a CBZ e CBZ+VAL si osservano valori non statisticamente differenti dal controllo. Dopo la fase di depurazione si osserva un'inibizione dell'attività dell'enzima negli organismi co-esposti a CBZ+VAL.

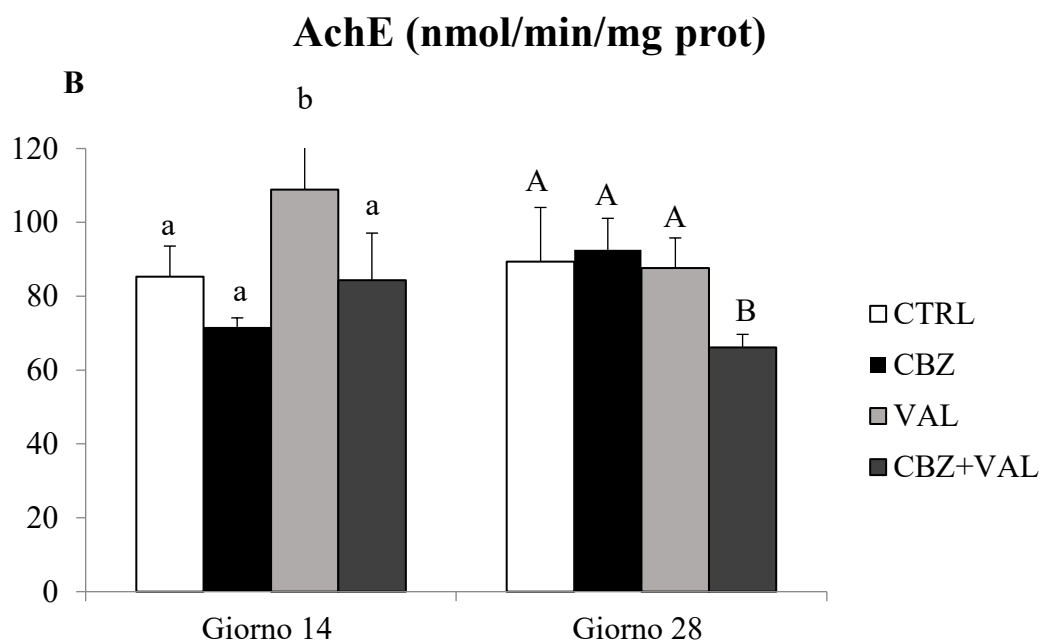
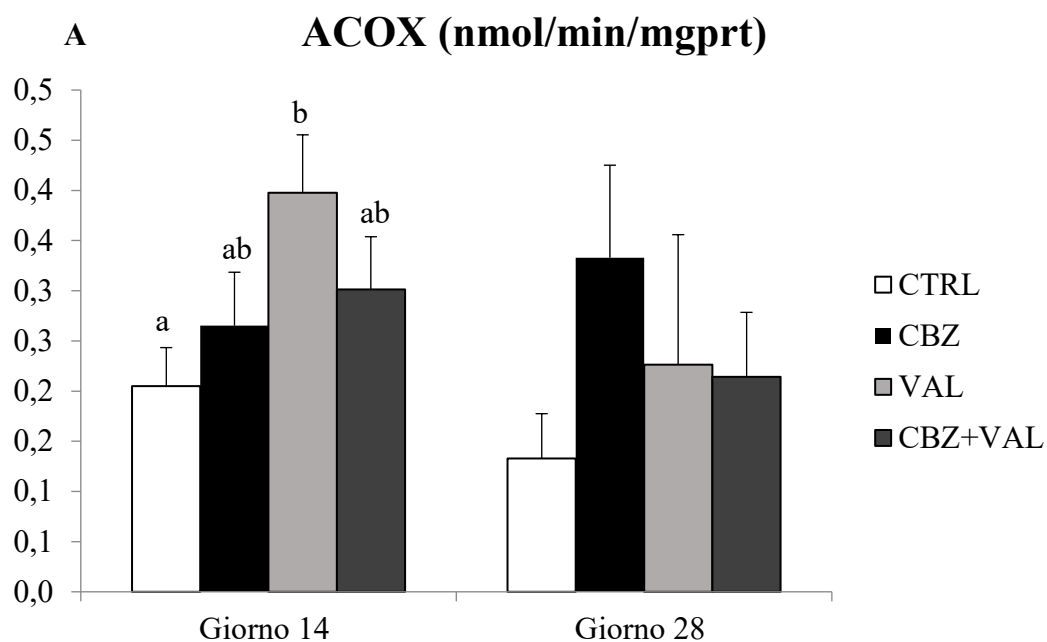
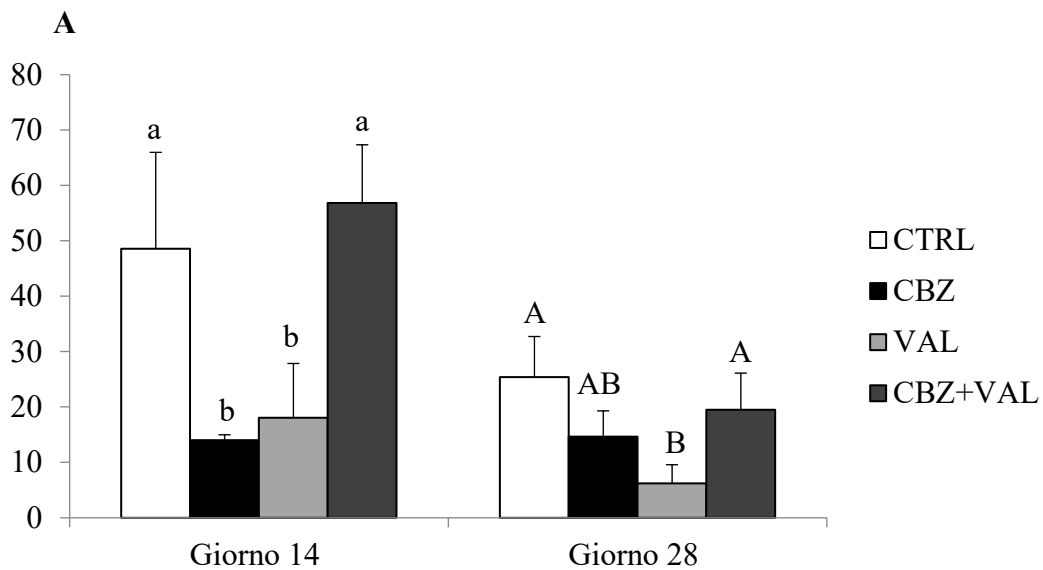


Figura 6. Risposte cellulari specifiche. 6A) Attività dell'enzima acil-CoA ossidasi (AcOX); 6B) Attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AchE). I dati sono espressi come media \pm dev.st. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie. Le lettere in minuscolo e le lettere in maiuscolo indicano le differenze tra i trattamenti rispettivamente a giorno 14 e 28.

Per quanto riguarda l'accumulo di prodotti di perossidazione lipidica, l'analisi del contenuto di lipofuscina mostra a 14 giorni una diminuzione statisticamente significativa negli organismi esposti singolarmente a CBZ e VAL rispetto al controllo; questo andamento si mantiene anche nella fase di depurazione in cui si riscontra una riduzione di questo prodotto di perossidazione lipidica negli organismi esposti singolarmente a CBZ e VAL, mentre nei mitili co-esposti non si misurano differenze rispetto alla condizione di controllo (Figura 7A).

L'accumulo di lipidi neutri non ha rilevato differenze statisticamente significative; tuttavia, si osserva un aumento del contenuto di queste sostanze di riserva negli organismi esposti singolarmente a VAL (VAL, CBZ+VAL) e questo andamento si mantiene nella fase di depurazione (Figura 7B).

Lipofuscina (int/ μm^2)



Lipidi neutri (int/ μm^2)

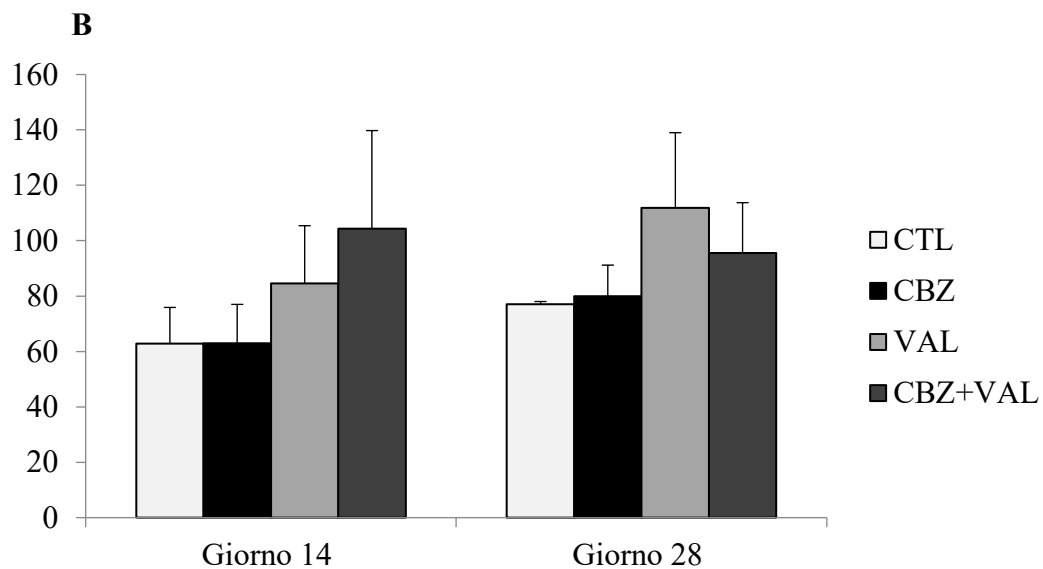


Figura 7. Risposte dei biomarker cellulari analizzate sui mitili esposti. 7A) Livelli di lipofuscina; 7B) Livelli di lipidi neutri. I dati sono espressi come media \pm dev.st. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie. Le lettere in minuscolo e le lettere in maiuscolo indicano le differenze tra i trattamenti rispettivamente a giorno 14 e 28.

In figura 8 sono riportati i risultati relativi alle analisi del sistema ossidativo, sia in termini di attività dei singoli enzimi antiossidanti che come capacità antiossidante totale nei confronti dei radicali perossilici e idrossilici.

Un generale aumento dell'attività della catalasi si osserva a giorno 14 in tutti gli organismi esposti rispetto al controllo, con un'induzione statisticamente significativa per i mitili esposti a CBZ. Dopo 14 giorni di depurazione il marcato aumento dell'attività si osserva per gli organismi esposti a VAL, sia singolarmente che in combinazione con la CBZ (Figura 8A).

L'attività della glutazione S-transferasi (Figura 8B) mostra un'induzione statisticamente significativa a 14 giorni per gli organismi esposti a CBZ (CBZ e CBZ+VAL), mentre a 28 giorni tale induzione è misurata negli organismi esposti a VAL (VAL e CBZ+VAL).

L'attività delle glutazione perossidasi (Figure 8C, 8D) non mostra variazioni statisticamente significative; tuttavia, si osserva un aumento nei valori medi di attività a 14 giorni per gli esposti a CBZ e un'inibizione negli organismi trattati con il VAL.

L'attività della glutazione reduttasi (Figura 8F) mostra a 14 giorni un'induzione negli organismi esposti a CBZ (CBZ e CBZ+VAL), con una differenza statisticamente significativa nei mitili trattati singolarmente; al termine della fase di depurazione si osserva un'induzione statisticamente significativa per gli organismi esposti al VAL.

I livelli di glutazione totale e la capacità antiossidante totale (Figure 8G, 8H, 8I) nei confronti dei radicali perossilici e dei radicali idrossilici non mostrano variazioni significative tra gli organismi di controllo e gli esposti sia a 14 che a 28 giorni.

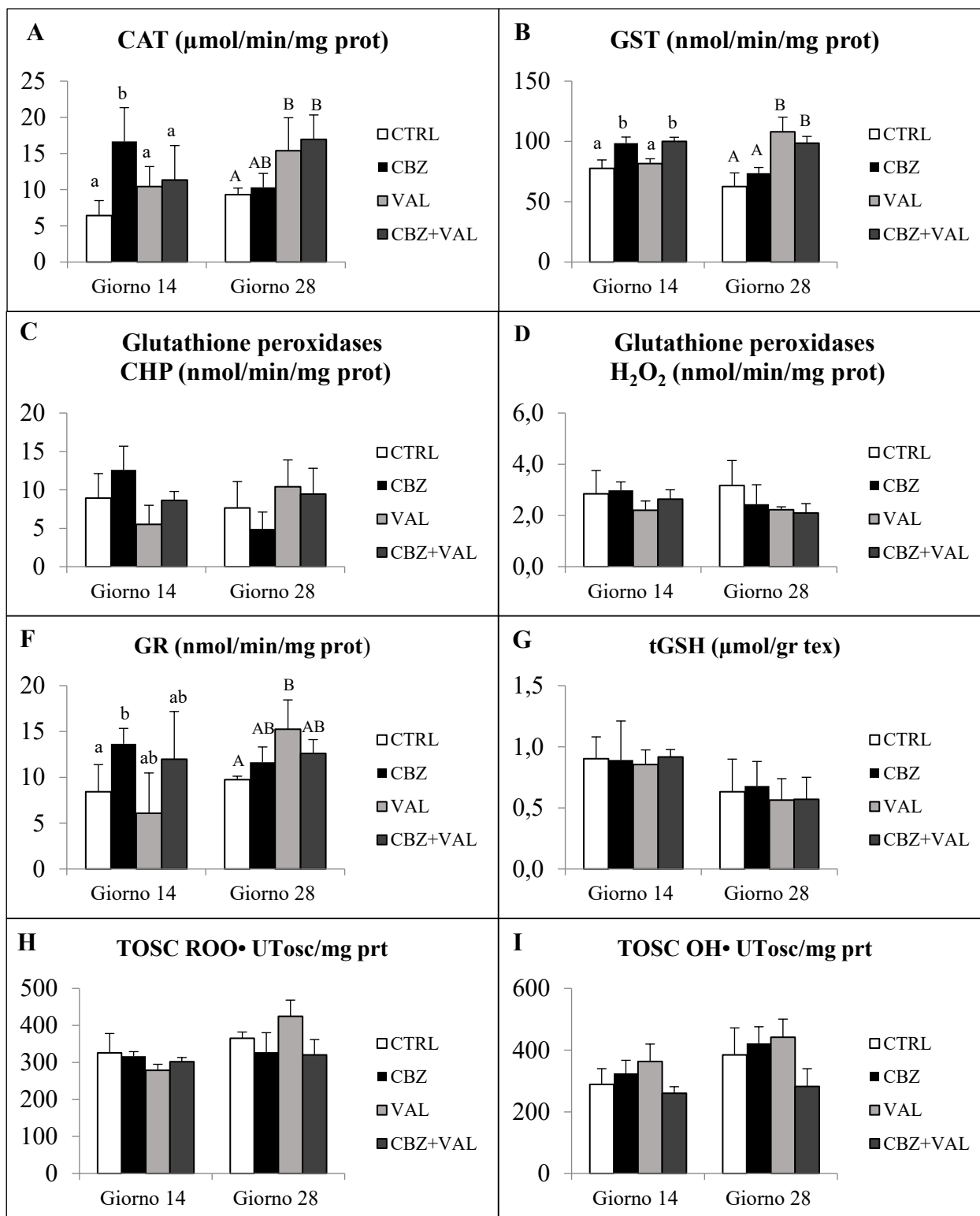


Figura 8. Risposte del sistema antiossidante analizzate sugli esposti. 8A) Attività dell'enzima catalasi (CAT); 8B) Attività della glutazione-S-transferasi (GST); 8C) attività

delle perossidasi su substrati organici (GPX Cu); 8D) Attività delle perossidasi su substrati inorganici (GPX H₂O₂); 8E) Attività dell'enzima glutatione reduttasi (GR); 8F) Quantità totale di glutatione (GSH); 8G) Misura della capacità antiossidante totale nei confronti dei radicali perossilici (ROO[·]); 8H) Misura della capacità antiossidante totale nei confronti dei radicali idrossilici ([·]OH). I dati sono espressi come media ± dev.st. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie. Le lettere in minuscolo e le lettere in maiuscolo indicano le differenze tra i trattamenti rispettivamente a giorno 14 e 28.

5. DISCUSSIONE

Il progresso della scienza medica nel secolo scorso e lo sviluppo di nuovi e più efficienti farmaci hanno permesso di trattare diverse patologie, con un incremento dell'aspettativa di vita, determinando, tuttavia, la presenza ubiquitaria di questi composti nell'ecosistema marino. Tali contaminanti di emergente preoccupazione sono stati rilevati nell'acqua di mare e nei sedimenti in tutto il mondo ma nonostante questo, le nostre conoscenze sul loro bioaccumulo e sul potenziale ecotossicologico sono ancora limitate, in particolare per gli organismi marini (Mezzelani et al., 2018a). Esperimenti di laboratorio hanno suggerito la capacità delle specie marine di accumulare varie classi di farmaci e l'insorgenza di effetti deleteri dai livelli molecolari fino a quelli fisiologici. Un aspetto di fondamentale rilevanza ambientale, ancora poco indagato, è quello legato al fatto che gli organismi acquatici vengono esposti, per tutta la loro esistenza, non a composti isolati ma a miscele complesse di contaminanti, e ovviamente alle miscele di farmaci (Mezzelani et al., 2020; Swiacka et al., 2019). In base al tipo di interazione tra le varie molecole possono generarsi effetti additivi (pari alla somma dei singoli effetti), sinergici (interazione positiva, con effetti superiori rispetto alla somma dei singoli effetti) e antagonisti (interazione negativa, minore della somma dei singoli effetti) (Mezzelani et al., 2018a; Crain et al., 2008; Heugens et al., 2001; Holmstrup et al., 2010; Jackson et al., 2016, Heye et al., 2019). In quest'ottica il presente studio ha avuto come obiettivo quello di indagare i meccanismi di interazione di Carbamazepina (CBZ) e Valsartan (VAL) nel mitilo Mediterraneo *Mytilus galloprovincialis*. Studi pregressi hanno infatti dimostrato la capacità di *Mytilus galloprovincialis* di accumulare composti farmaceutici e in particolare uno studio effettuato nei mari Adriatico e Tirreno ha evidenziato come l'antiepilettico Carbamazepina (CBZ) e l'antipertensivo Valsartan (VAL) siano le molecole più misurate nelle popolazioni di mitili che naturalmente abitano questi ecosistemi, con una frequenza di detezione rispettivamente del 91% e 55% degli organismi campionati nel corso di 4 anni (Mezzelani et al., 2020). Nel presente lavoro di tesi i risultati ottenuti dalle analisi chimiche evidenziano la presenza di CBZ e VAL nei mitili prelevati dall'allevamento, in accordo con i risultati dello studio Mezzelani et al., 2020. La detezione di CBZ negli organismi di controllo fino al settimo giorno di esposizione corrobora la teoria sul

comportamento di pseudo-persistente della CBZ, evidenziato in precedenza da altri studi (Almeida et al., 2014, 2015, 2017; Miller et al., 2019), mentre i livelli di VAL <LOD negli organismi di controllo all'inizio dell'esposizione (giorno 0), permettono di ipotizzare per la prima volta una maggiore capacità di metabolismo e/o escrezione di questa molecola, rispetto alla CBZ. Le due molecole analizzate hanno un background di conoscenze diverse: sulla CBZ ritroviamo numerosi studi e abbiamo un'ampia bibliografia a cui fare riferimento, al contrario per il VAL, nonostante sia uno dei sartani più frequentemente rilevati, le informazioni sui meccanismi di uptake, bioaccumulo e escrezione non sono disponibili, mentre i limitati studi di tossicità sono principalmente incentrati sugli effetti acuti in organismi appartenenti a diversi livelli trofici (Godoy et al., 2015). Nel presente lavoro di tesi i livelli di bioaccumulo di CBZ e VAL negli organismi esposti singolarmente riflettono le concentrazioni misurate nel Mare Adriatico (Mezzelani et al., 2020).

Il bioaccumulo di CBZ è stato appurato con livelli inferiori anche in *Geukensia demissa* nella Baia di San Francisco (2,4 ng/g, Klosterhaus et al., 2013), in *Mytilus edulis* lungo la costa belga (fino a 11 ng/g, Wille et al., 2011), in *Mytilus galloprovincialis* nel sud-est della Francia (fino a 3,5 ng/g dw, Martínez-Bueno et al., 2013). La CBZ difatti ha caratteristica di idrofobicità, permettendo la ripartizione nella porzione lipidica e quindi il bioaccumulo (Liu et al., 2015; Almeida et al., 2015). Contardo Jara et al. (2011) hanno determinato l'accumulo di CBZ nel mitilo *Dreissena polymorpha* dopo 1, 4 e 7 giorni di esposizione, (dosi comprese tra 0,236 e 236 µg/L) ed è stato riscontrato un aumento tempo- dipendente dell'accumulo di CBZ a tutte le concentrazioni, dimostrando il rischio di bioaccumulo di CBZ nelle popolazioni di fauna selvatica.

In merito al VAL, come anticipato in precedenza le informazioni relative al bioaccumulo sono limitate allo studio condotto nei mari Adriatico e Tirreno e all'indagine svolta in Repubblica Ceca sull'anellide d'acqua dolce *Erpobdella octoculata* che ha evidenziato livelli fino a 2,3 ng/g (Grabicova et al., 2015).

L'aspetto sicuramente più interessante che emerge dai risultati del bioaccumulo del presente studio di tesi è legato alla modulazione dell'uptake negli organismi esposti alla miscela binaria: in questo caso si osserva un trend completamente opposto rispetto a quello misurato negli organismi esposti singolarmente, con livelli di CBZ più bassi e livelli di VAL superiori. Considerata la mancanza di informazioni a riguardo, il risultato

ottenuto merita un ulteriore approfondimento e l'integrazione con le analisi delle risposte biologiche.

Al termine del periodo di depurazione (giorno 28) si osservano livelli di CBZ e VAL al di sotto del limite di detezione (LOD), suggerendo la capacità degli organismi di attivare dei meccanismi di escrezione di queste molecole e depurarsi se mantenuti in acqua priva delle due sostanze per 14 giorni.

Al fine di poter investigare al meglio il potenziale ecotossicologico di CBZ, VAL e della loro interazione, in questo esperimento le analisi del bioaccumulo sono state integrate con lo studio di un gran numero di risposte biologiche in grado di rilevare l'insorgenza di alterazioni subletali. Tra i biomarker indagati troviamo le alterazioni della membrana lisosomiale e dei parametri immunitari, le variazioni del metabolismo lipidico e le alterazioni a carico del sistema ossidativo e le risposte di danno cellulare che sono, tipicamente, considerati parametri in grado di evidenziare in maniera sensibile la comparsa dei primi effetti di disturbo causati dai contaminanti (Regoli et al., 2011).

Nel complesso, molti studi volti a valutare lo stato di salute degli organismi dopo l'esposizione a contaminanti ambientali, prendono in considerazione i parametri emocitari dei mitili in quanto direttamente coinvolti nella risposta immunitaria (Carella et al., 2015; Garcia-Garcia et al., 2008; Cima 2010; Tanguy et al., 2013; Dyrynda et al., 1997; Pipe et al., 1997; Hine 1999; Wootton et al., 2003; Parisi et al., 2008; Kuchel et al., 2010; Accorsi et al., 2013). Il sistema immunitario comprende componenti cellulari (emociti) e umorali responsabili di una risposta immunitaria efficace con l'obiettivo di proteggere l'organismo da potenziali pericoli (Bouallegui 2019). Nel presente lavoro di tesi, le risposte misurate negli emociti sono state analizzate anche dopo 7 giorni di esposizione poiché risultano essere particolarmente sensibili ed una possibile variazione la si può evidenziare fin dai primi stadi di esposizione. La stabilità delle membrane lisosomiali (LMS) è stata valutata con il Test del tempo di Ritenzione del Rosso Neutro, che misura l'integrità della membrana lisosomiale in base alla capacità di questi organelli di trattenere il colorante acidofilo rosso neutro (Canesi et al., 2007). La destabilizzazione delle membrane lisosomiali in tutti gli organismi esposti sia singolarmente che alla miscela di farmaci, in tutte le fasi dell'esposizione e del recupero, confermano l'estrema sensibilità di questo parametro nel rilevare l'insorgenza di condizioni di stress, che permangono anche dopo un periodo di recovery in acqua priva delle molecole testate. Martin-Diaz et

al. nel 2009, avevano osservato una riduzione significativa dell'integrità delle membrane lisosomiali a seguito dell'esposizione di *Mytilus galloprovincialis* a concentrazioni di 0,1 e 10 µg/L di CBZ. La riduzione di LMS è stata descritta anche nella vongola *Ruditapes philippinarum* dopo 35 giorni di esposizione a 0,1-50 µg/L CBZ (Aguirre-Martínez et al., 2013); allo stesso modo Tsiaka et al. (2013) hanno riportato una diminuzione del 50% dell'assorbimento del rosso neutro negli emociti di *Mytilus galloprovincialis* trattate con carbamazepina da 0,01 a 10 µg/L.

I risultati ottenuti con il Test del tempo di Ritenzione del Rosso Neutro possono essere integrati con altri parametri del sistema immunitario, come il rapporto granulociti/ialinociti e la capacità di fagocitosi. La fagocitosi costituisce una delle più importanti risposte immunitarie cellulo-mediate nei mitili e gli emociti rappresentano le cellule deputate ai processi di riconoscimento, adesione, inglobamento e degradazione del not-self (Bachère et al., 1995). Tali cellule sono state caratterizzate in granulociti e ialinociti. Gli ialinociti si differenziano dai granulociti per un diametro medio minore, un minore contenuto di granuli citoplasmatici, una scarsa abilità fagocitaria e sono coinvolti nei processi di coagulazione e incapsulamento; i granulociti invece, mostrano attività fagocitaria, correlabile morfologicamente alla maggiore grandezza e granulosità di tale tipologia cellulare (Carballal et al., 1997b; Mosca et al., 2005). L'estrema sensibilità dei parametri emocitari nel rilevare gli effetti iniziali dell'esposizione a potenziali fattori di stress è stata ulteriormente confermata nel presente studio dalle variazioni significative osservate a giorno 7 per la capacità di fagocitosi e per il rapporto granulociti/ialinociti: l'induzione della capacità di fagocitosi negli organismi esposti alla miscela di CBZ e VAL riflette l'aumento del rapporto granulociti/ialinociti; tale variazione è risultata essere transitoria in quanto dopo 14 giorni non si sono osservate variazioni di questi parametri. Tuttavia, gli effetti rilevati per gli organismi esposti singolarmente non sono più evidenti una volta esposti alla miscela binaria, sottolineando anche in questo caso l'effetto antagonista delle due molecole.

Gli effetti genotossici sono stati analizzati come comparsa di micronuclei (MN). Negli organismi esposti singolarmente a VAL è stato osservato un aumento significativo della frequenza di micronuclei dopo 14 giorni di esposizione; tale dato si può ricollegare ad un potenziale effetto genotossico di questo farmaco come riportato in uno studio svolto su specie target (pazienti umani) da Huerta et al., 2014. Tuttavia, l'aumento della comparsa

dei micronuclei potrebbe essere correlato ad un aumento del turnover cellulare mediato dal composto stesso, piuttosto che all'insorgenza di un vero e proprio danno genotossico. Tale effetto non viene registrato negli organismi esposti alla miscela di farmaci, suggerendo il potenziale effetto antagonista delle due molecole testate; inoltre, la depurazione risulta efficace poiché a 28 giorni non si riscontrano differenze significative e i livelli anche degli organismi esposti al VAL si riassetano attorno ai valori di controllo. L'attività dell'Acil-CoA ossidasi (AcOX) è considerata un biomarker di risposta specifica di alterazione del metabolismo degli acidi grassi; questo enzima catalizza la prima reazione della β -ossidazione mitocondriale degli acidi grassi e di conseguenza un'alterazione della sua attività può portare ad una cattiva gestione delle risorse energetiche (Gorbi et al., 2012). L'acetilcolinesterasi (AChE), invece, è uno degli enzimi coinvolti nella trasmissione del segnale nervoso e catalizza l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina con produzione di colina e acetato. In entrambe le analisi si è osservata un'induzione statisticamente significativa negli organismi esposti singolarmente al VAL; tuttavia, la presenza limitata di studi riguardanti questa molecola non ci permette di chiarire il motivo della modulazione della neurotrasmissione e del catabolismo lipidico da parte del VAL. In merito all'efficacia della fase di depurazione, al giorno 28 l'attività dell'AcOX non ha mostrato differenze significative tra gli esposti, confermando la buona riuscita del periodo di recovery; viceversa, nell'attività dell'AChE si è osservata un'inibizione negli organismi esposti alla miscela binaria (CBZ+VAL). Anche in questo caso i nostri dati non ci permettono di ipotizzare la causa di questa variazione.

Gli effetti degli inquinanti sono spesso associati ad uno squilibrio del metabolismo degli acidi grassi e all'accumulo di lipidi neutri e lipofuscina nel sistema vacuolare lisosomiale. L'accumulo lisosomiale di lipidi neutri nelle ghiandole digestive dei mitili si è dimostrato un utile indicatore di alterazione della fisiologia cellulare (Koehler, 2004), e l'accumulo di lipofuscina rappresenta un indicatore del livello di stress ossidativo nella cellula, correlato al livello di perossidazione lipidica di membrana (Viarengo et al., 2007; Martin-Diaz et al., 2009). L'effetto antagonista delle molecole testate è evidente nei risultati dall'accumulo di lipofuscina: si è osservata una diminuzione significativa negli organismi esposti singolarmente a CBZ e VAL, mentre nei mitili co-esposti non si misurano differenze rispetto alla condizione di controllo. Questi risultati si discostano da quanto

ottenuto in studi precedenti nei quali l'esposizione a CBZ portava ad un incremento dell'accumulo di lipofuscina: Freitas et al. nel 2016 avevano registrato un aumento in *Scrobicularia plana* quando esposto a 3.00 µg/L di CBZ, mentre un aumento simultaneo di lipofuscina e lipidi neutri è stato riportato in *Mytilus galloprovincialis* trattato con CBZ (Dell'Acqua et al., 2019; Gomiero et al., 2018; Martin-Diaz et al., 2009; Nardi et al., 2017). Nel presente studio l'esposizione a 0.5µg/L di CBZ non ha determinato l'aumento di lipofuscina e di lipidi neutri suggerendo che tali effetti possano essere dose-dipendente. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono prodotti naturalmente durante diverse fasi del metabolismo aerobico tra cui la fosforilazione ossidativa, le catene di trasporto degli elettroni nei mitocondri, l'attività degli enzimi ossido-riduttasi che producono ROS come prodotti intermedi o finali, o anche reazioni immunologiche come la fagocitosi (Halliwell e Gutteridge, 2007). In condizioni fisiologiche normali, la tossicità dei ROS viene contrastata dall'azione delle difese antiossidanti. Tuttavia, l'equilibrio cellulare tra le forze proossidanti e difese antiossidanti può essere influenzato dai farmaci, come altri inquinanti, che possono sia diminuire la capacità degli antiossidanti di rimuovere i radicali liberi o aumentare la formazione intracellulare di ROS (Regoli e Giuliani, 2013). L'effetto delle molecole testate sul metabolismo ossidativo è stato investigato con l'analisi delle variazioni delle attività dei singoli enzimi antiossidanti e della capacità antiossidante totale. Al giorno 14 di esposizione l'aumento delle attività della catalasi (CAT), glutatione reduttasi (GR) e glutatione-S-transferasi (GST) nelle esposizioni CBZ sia singolarmente che in miscela con il VAL indicano il coinvolgimento del sistema ossidativo in risposta alla carbamazepina. L'aspetto interessante è legato alle variazioni misurate per questi enzimi anche al termine del periodo di depurazione. Le GST sono una famiglia di enzimi di biotrasformazione di fase II coinvolti nel metabolismo dei composti xenobiotici (Regoli e Giuliani, 2014). L'aumentata attività, durante tutte le fasi dello studio suggerisce l'attivazione degli enzimi di biotrasformazione per facilitare il metabolismo e l'eliminazione di questi farmaci. Questa ipotesi è sostenuta dai risultati del bioaccumulo che evidenziano al termine della fase di depurazione livelli di CBZ e VAL inferiori al limite di detezione strumentale. Freitas et al. (2016) hanno riportato un aumento significativo dell'attività GST dopo che *Scrobicularia plana* è stata esposta a 3 µg/L di carbamazepina per 96 ore. Di nuovo, Martin-Diaz et al. (2009) hanno riportato un aumento significativo dell'attività della GST quando *Mytilus galloprovincialis* è stato

esposto a 0,1 e 10 µg/L di carbamazepina per 7 giorni. Il contemporaneo aumento dell'attività della GR nel nostro studio corrobora la richiesta di aumentare la conversione del glutatione ossidato (GSSG) in GSH ridotto. A concentrazioni più elevate, il GSH ridotto può eliminare direttamente i ROS ed è fondamentale per resistere allo stress ossidativo (Viarengo et al., 1995). Almeida ed il suo gruppo di ricerca avevano registrato un'induzione della GR nei tessuti molli di *Venerupis philippinarum* e *Verticordia decussata* esposti a carbamazepina (0,3-9 µg L⁻¹) per 96 ore (Almeida et al., 2014). In uno studio più recente condotto su *Carassium Carassium*, durante l'esposizione di 7 giorni a diclofenac, carbamazepina e la loro miscela, le attività di GST, CAT e GR erano significativamente aumentate in modo tempo-dipendente in tutti i trattamenti (Nkoom et al., 2020). Le minime variazioni ottenute per le glutatione perossidasi, i livelli di glutatione totale e la capacità antiossidante totale nei confronti dei radicali idrossilici e perossilici suggeriscono che l'effetto delle molecole testate sul metabolismo ossidativo rimangono tuttavia limitate. Considerati gli studi pregressi che hanno dimostrato l'insorgenza di stress ossidativo in risposta a concentrazioni più elevate di CBZ (1.00-3.00µg/L, Mezzelani et al., 2021; Freitas et al., 2016), è possibile ipotizzare che l'effetto di questa molecola sul mitilo mediterraneo sia di natura dose-dipendente.

6. CONCLUSIONE

In conclusione, i risultati di questo lavoro di tesi hanno permesso di evidenziare gli effetti e le interazioni di livelli ambientalmente realistici dei farmaci carbamazepina e valsartan nel *Mytilus galloprovincialis*. È stato interessante osservare come i tassi di bioaccumulo delle due molecole siano diversi nei singoli trattamenti rispetto alla miscela, con i livelli di carbamazepina notevolmente più bassi nei mitili co-esposti. In merito all'insorgenza di alterazioni biologiche, i parametri più sensibili sono stati quelli legati al sistema immunitario e alle singole difese antiossidanti, che hanno inoltre suggerito l'attivazione di meccanismi di biotrasformazione/metabolismo/escrezione delle molecole studiate. La possibilità di indagare il potenziale ecotossicologico di questi farmaci non solo al termine della fase di esposizione ma anche di quella di depurazione, ha permesso inoltre di osservare come l'ipotesi del metabolismo (evidenziato dai biomarker) sia ulteriormente confermata dai livelli di bioaccumulo misurati al termine del periodo di recovery, caratterizzati da concentrazioni tissutali di CBZ e VAL inferiori al limite di detezione strumentale. La maggior parte delle alterazioni sono state osservate negli organismi esposti alle singole molecole e l'assenza di differenze significative nei mitili co-esposti ha permesso di ipotizzare che l'interazione tra CBZ e VAL sia di tipo antagonista. Tale studio ha, inoltre, sottolineato l'importanza di applicare un approccio multidisciplinare, integrando analisi chimiche, biochimiche e cellulari al fine di ampliare le conoscenze scientifiche su questa tipologia di contaminazione. Data la rilevanza ambientale delle due molecole oggetto di studio e le poche informazioni sugli effetti causati dal VAL in specie non target, ulteriori studi sono necessari per chiarire il meccanismo di azione di questo composto in organismi non target. Inoltre, indagini future saranno necessarie per comprendere l'effetto a lungo termine di miscele di farmaci più frequentemente rilevati negli ecosistemi acquatici.

Bibliografia

- Accorsi, A., Bucci, L., de Eguileor, M., Ottaviani, E., & Malagoli, D. (2013). Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. *Fish & shellfish immunology*, 34, 1260-1268.
- Aguirre-Martínez, G. V., DelValls, T. A., & Martín-Díaz, M. L. (2016). General stress, detoxification pathways, neurotoxicity and genotoxicity evaluated in *Ruditapes philippinarum* exposed to human pharmaceuticals. *Ecotoxicology and environmental safety*, 124, 18–31.
- Akcha, F., Leday, G., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2004). Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutation research*, 552(1-2), 197–207.
- Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R. (2014). Presence of carbamazepine in coastal systems: effects on bivalves. *Aquat. Toxicol.* 156, 74–87.
- Almeida, Â., Freitas, R., Calisto, V., Esteves, V. I, Schneider, R. J, Soares, A. M.V.M, & Figueira, E. (2015). Chronic toxicity of the antiepileptic carbamazepine on the clam *Ruditapes philippinarum*. *Comparative biochemistry and physiology*, 172-173, 26-35.
- Almeida, A., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R. (2017). Toxicity associated to uptake and depuration of carbamazepine in the clam *Scrobicularia plana* under a chronic exposure. *Sci. Total Environ.* 580, 1129–1145.
- Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Maulvault, A.L., Tediosi, A., Fernández-Tejedor, M., van den Heuvel, F.H., Kotterman, M.J., Marques, A., & Barceló, D. (2015). Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environmental research*, 143 Pt B, 56-64.
- Alygizakis, N. A., Gago-Ferrero, P., Borova, V. L., Pavlidou, A., Hatzianestis, I., & Thomaidis, N. S. (2016). Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals,

drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *The Science of the total environment*, 541, 1097–1105.

Al-sarraf, A.M., Hashim, H., Sahib, H.B., Salih, H.N., Al-zubaidy, A., Alwan, I., & Rabeea, I.S. (2014). Effect of Valsartan on Echocardiographic Ejection Fraction, Brain Natriuretic Peptide and Malondialdehyde in Trastuzumab Treated Females with Breast Cancer.

Andreozzi, R., Raffaele, M., & Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), 1319–1330.

Arévalo, J., Ruiz, L. M., Parada-Albarracín, J. A., González-Pérez, D. M., Pérez, J., Moreno, B., Gómez, M. A. (2012). Wastewater reuse after treatment by MBR. Microfiltration or ultrafiltration? *Desalination*, 299, 22-27.

Bachère E., Mialhe E., Noël D., Boulo V., Morvan A. & Rodriguez J. (1995). Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture*, 132: 17-32.

Bebiano, M.J., Gonzalez-Rey, M. (2015). Ecotoxicological Risk of Personal Care Products and Pharmaceuticals, *Aquatic Ecotoxicology, Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks. Academic Press Ch*, 16, 383-416.

Benedetti, M., Ciaprini, F., Piva, F., Onorati F., Fattorini, D., Notti, A., Ausili, A., Regoli, F. (2012). A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environment International*, 38, 17-28.

Bouallegui Y. (2019). Immunity in mussels: An overview of molecular components and mechanisms with a focus on the functional defenses. *Fish & shellfish immunology*, 89, 158–169.

Bringolf, R. B., Heltsley, R. M., Newton, T. J., Eads, C. B., Fraley, S. J., Shea, D., & Cope, W. G. (2010). Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(6), p. 1311.

- Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Huang, J., & Wang, B. (2016). Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs. *Emerging Contaminants*, 2 (3).
- Cabello F.C., Godfrey H.P., Tomova A., Ivanova L., Dölz H., Millanao A., Buschmann A.H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* 15, 1917–1942.
- Calisi A., Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Schettino T. (2008) Morphometric alterations in *Mytilus galloprovincialis*: a new biomarker. *Environmental Toxicology and Chemistry* 6, 1435-1441.
- Calisto, V., Bahlmann, A., Schneider, R. J, & Esteves, V. I. (2011). Application of an ELISA to the quantification of carbamazepine in ground, surface and wastewaters and validation with LC–MS/MS. *Chemosphere*, 84, 1708-1715.
- Canesi, L., Lorusso, L. C., Ciacci, C., Betti, M., Rocchi, M., Pojana, G., & Marcomini, A. (2007). Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: in vitro and in vivo studies. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 81(1), 36–44.
- Carballal M.J., Lopez C., Azevedo C. & Villalba A. (1997b). In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 403-416.
- Carella, F., Feist, S. W., Bignell, J. P., & De Vico, G. (2015). Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *Journal of invertebrate pathology*, 131, 107–120.
- Chapman, P.M., McDonald, B.G., and Lawrence, G. S. (2002) Weight-of-evidence issues and frameworks for sediment quality (and other) assessments. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8, 1489-515.
- Chapman, P., Hollert, H. (2006) Should the Sediment Quality Triad Become a Tetrad, a Pentad, or Possibly even a Hexad?. *J Soils Sediments* 6, 4–8.

Chapman P.M., (2007) Determining when contamination is pollution – weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International* 33, 492-501.

Chen, L., Guo, C., Sun, Z., & Xu, J. (2021). Occurrence, bioaccumulation and toxicological effect of drugs of abuse in aquatic ecosystem: A review. *Environmental research*, 200.

Chien, T.V., Thảo, T., Phuong, L.D., Thắm, P., Tung, N.Q., & Lộc, T.V. (2019). Synthesis of Valsartan as drug for the treatment of hypertension: Synthesis of Valsartan as drug for the treatment of hypertension. *Vietnam Journal of Chemistry*, 57, 343-346.

Cima, F. (2010). Microscopy methods for morpho-functional characterisation of marine invertebrate haemocytes.

Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., & Wiegand, C. (2011). Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 105(3-4), 428–437.

Crain, C. M., Kroeker, K., & Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology letters*, 11(12), 1304–1315.

CULLIGAN ITALIANA S.P.A. La depurazione delle acque reflue, fascicolo pubblicato sul sito internet della società stessa.

Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J., & Viarengo, A. (2008). A "weight of evidence" approach for the integration of environmental "triad" data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integrated environmental assessment and management*, 4(3), 314–326.

Dell'Acqua, O., Ferrando, S., Chiantore, M., Asnaghi, V. (2019). The impact of ocean acidification on the gonads of three key Antarctic benthic macroinvertebrates. *Aquat. Toxicol.* 210, 19–29.

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.

Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.

Du, B., Haddad, S. P., Luek, A., Scott, W. C., Saari, G. N., Kristofco, L. A., Connors, K. A., Rash, C., Rasmussen, J. B., Chambliss, C. K., & Brooks, B. W. (2014). Bioaccumulation and trophic dilution of human pharmaceuticals across trophic positions of an effluent-dependent wadeable stream. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1656), 20140058.

Dyrynda, E., Pipe, R. & Ratcliffe, N. (1997). Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res* 289, 527–536.

Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment, *Emerging Contaminants*, vol. 3, no. 1, pp. 1-16.

EMA. (2018). Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use (EMA/CHMP/SWP/4447/00 corr 2). 4/48

.EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) – CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use). (2005). Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use.

EUROPEA, C. (2019). Approccio strategico dell'Unione europea riguardo all'impatto ambientale dei farmaci. Bruxelles .

Fabbri E. (2015). Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1340:20-28.

- Fabbri, E., & Franzellitti, S. (2016). Human pharmaceuticals in the marine environment: focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(4), 799-812.
- Fasulo, S., Marino, S., Mauceri, A., Maisano, M., Giannetto, A., D'Agata, A., Parrino, V., Minutoli, R., & Domenico, E.D. (2010). A multibiomarker approach in *Coris julis* living in a natural environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73 7, 1565-73.
- FDA-CDER. (1998). Guidance for Industry-Environmental Assessment of Human Drugs and Biologics Applications, Revision 1.
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 76(2), 122–159.
- Fernández-López, C., González García, M., Sánchez-Lozano, J. M. (2021). Analysis of WWTPs technologies based on the removal efficiency of Pharmaceutical Activated Compounds for water reuse purposes. A Fuzzy Multi-Criteria Decision Making approach, *Journal of Water Process Engineering*, 42, 102098.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2013). The mode of action (MOA) approach reveals interactive effects of environmental pharmaceuticals on *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology*, 140-141, 249-56.
- Freitas, R., Almeida, Â., Calisto, V., Velez, C., Moreira, A., Schneider, R. J., Esteves, V. I., Wrona, F. J., Figueira, E., & Soares, A. (2016). The impacts of pharmaceutical drugs under ocean acidification: New data on single and combined long-term effects of carbamazepine on *Scrobicularia plana*. *The Science of the total environment*, 541, 977–985.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Förlin, L., Bolognesi, C., & Sturve, J. (2004). DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutation research*, 552(1-2), 187–195.
- García-García, E., Prado-Alvarez, M., Novoa, B., Figueras, A., & Rosales, C. (2008). Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Developmental and comparative immunology*, 32(6), 637–653.

- Gaw, S., Thomas, K. V., & Hutchinson, T. H. (2014). Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1656), 20130572.
- Gazeau, F., Parker, L.M., Comeau, S., Gattuso, J.-P., O'Connor, W.A., Martin, S., Portner, H.-O., Ross, P.M. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Mar. Biol.* 160 (8), 2207–2245.
- Godoy, A. A., Kummrow, F., & Pamplin, P. A. (2015). Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment--A review. *Chemosphere*, 138, 281–291.
- Gomes, T., Pinheiro, J. P., Cancio, I., Pereira, C. G., Cardoso, C., & Bebianno, M. J. (2011). Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental science & technology*, 45(21), 9356–9362.
- Gomiero, A., Bellerby, R., Zeichen, M.M., Babbini, L., Viarengo, A. (2018). Biological responses of two marine organisms of ecological relevance to on-going ocean acidification and global warming. *Environ. Pollut.* 236, 60–70.
- Gorbi S., Bocchetti R., Binelli A., Bacchiocchi S., Orletti R., Nanetti L., Raffaelli F., Vignini A., Accoroni S., Totti C., Regoli F. (2012) Biological effects of palytoxin-like compounds from *Ostreopsis cf. ovata*: A multibiomarkers approach with mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 30.
- Gorbi, S., Avio, G., Benedetti, M., Totti, C., Accoroni, S., Pichierri, S., Bacchiocchi, S., Orletti, R., Graziosi, T., & Regoli, F. (2013). Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & shellfish immunology*, 35, 941-950.
- Grabicova, K., Grabic, R., Blaha, M., Kumar, V., Cerveny, D., Fedorova, G., & Randak, T. (2015). Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water research*, 72, 145–153.

Grković, N., Dimitrijević, M., Teodorović, V., Karabasil, N., Vasilev, D., Stajković, S., & Velebit, B. (2019). Factors influencing mussel (*Mytilus galloprovincialis*) nutritional quality. 60th International Meat Industry Conference (MEATCON2019) Iop Publishing Ltd, Bristol., 333, UNSP 012062

Gonzalez-Rey M., Bebianno M.J. (2011). Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ibuprofen distresses antioxidant defense system in mussel *Mytilus galloprovincialis* gills. *Aquatic Toxicology* 105, 264-269.

Gonzalez-Rey M., Bebianno M.J. (2012) Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33, 361-371.

Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2012). Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1248, 104-21.

Hagger J.A., Jones M.B., Leonard D.R., Owen R., Galloway T.S. (2006) Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* 2, 312-329.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine.: *Oxford University Press*.

Heberer T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters*, 131(1-2), 5–17.

Heugens, E. H., Hendriks, A. J., Dekker, T., van Straalen, N. M., & Admiraal, W. (2001). A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Critical reviews in toxicology*, 31(3), 247–284.

Hine, P.M. (1999). The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 367-385.

- Holmstrup, M., Bindesbøl, A. M., Oostingh, G. J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H. R., Loureiro, S., Soares, A. M., Ferreira, A. L., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P. E., Bayley, M., Svendsen, C., & Spurgeon, D. J. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *The Science of the total environment*, 408(18), 3746–3762.
- Huerta, I., Barasoain, M., Télez, M., Longa, M., Muga, J., Barrenetxea, G., Ortiz-Lastra, E., González, J., Criado, B., & Arrieta, I. (2014). Genotoxic evaluation of five Angiotensin II receptor blockers: in vivo and in vitro micronucleus assay. Mutation research. *Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 767, 1–7.
- Jackson, M. C., Loewen, C. J., Vinebrooke, R. D., & Chimimba, C. T. (2016). Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Global change biology*, 22(1), 180–189.
- Klosterhaus, S. L., Grace, R., Hamilton, M. Coreen, & Yee, D. (2013). Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environment international*, 54, 92-99.
- Koehler, A. (2004). The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 70(4), 257-76.
- Kosek, K., Luczkiewicz, A., Fudala-Książek, S., Jankowska, K., Szopińska, M., Svahn, O., Tränckner, J., Kaiser, A., Langas, V., Björklund, E. (2020). Implementation of advanced micropollutants removal technologies in wastewater treatment plants (WWTPs) - Examples and challenges based on selected EU countries. *Environmental Science & Policy*, 112, 213-226.
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R.N., Singh, G.G. (2010). Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol. Lett.* 13, 1419–1434.

- Kuchel, R. P., Raftos, D. A., Birch, D., & Vella, N. (2010). Haemocyte morphology and function in the Akoya pearl oyster, *Pinctada imbricata*. *Journal of invertebrate pathology*, 105(1), 36–48.
- Liu, J., Lu, G., Xie, Z., Zhang, Z., Li, S., & Yan, Z. (2015). Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. *The Science of the total environment*, 511, 54-62.
- Manzo, V., Honda, L., Navarro, O., Ascar, L., & Richter, P. (2014). Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from wastewater samples by rotating-disk sorptive extraction. *Talanta*, 128, 486-492
- Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., & Fabbri, E. (2009). Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology*, 94, 177-185.
- Martínez Bueno, M., Boillot, C., Fenet, H., Chiron, S., Casellas, C., & Gómez, E. (2013). Fast and easy extraction combined with high resolution-mass spectrometry for residue analysis of two anticonvulsants and their transformation products in marine mussels. *Journal of chromatography*, 1305, 27-34.
- Martínez Bueno, M. J., Boillot, C., Munaron, D., Fenet, H., Casellas, C., & Gómez, E. (2014). Occurrence of venlafaxine residues and its metabolites in marine mussels at trace levels: development of analytical method and a monitoring program. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(2), 601–610.
- Martínez-Morcillo, S., Rodríguez-Gil, J. L., Fernández-Rubio, J., Rodríguez-Mozaz, S., Míguez-Santiyán, M. P., Valdes, M. E., Barceló, D., & Valcárcel, Y. (2020). Presence of pharmaceutical compounds, levels of biochemical biomarkers in seafood tissues and risk assessment for human health: Results from a case study in North-Western Spain. *International journal of hygiene and environmental health*, 223(1), 10–21.
- Maruya, K. A, Vidal-Dorsch, D. E, Bay, S. M, Kwon, J. W, Xia, K., & Armbrust, K. L. (2012). Organic contaminants of emerging concern in sediments and flatfish collected

near outfalls discharging treated wastewater effluent to the Southern California Bight. *Environmental toxicology and chemistry*, 31, 2683-2688.

McDaniel L.D., Young E., Delaney J., Ruhnau F., Ritchie K.B., Paul J.H. (2010). High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science* 330, 50.

McEneff, G., Barron, L., Kelleher, B., Paull, B., & Quinn, B. (2014). A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. *The Science of the total environment*, 476-477, 317-326.

Metcalf, C. D., Koenig, B. G., Bennie, D. T., Servos, M., Ternes, T. A., & Hirsch, R. (2003). Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environmental toxicology and chemistry*, 22(12), 2872–2880.

Mezzelani, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d'Errico, G., Benedetti, M., Milan, M., Bargelloni, L., & Regoli, F. (2016). Transcriptional and cellular effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in experimentally exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 180, 306–319.

Mezzelani, M., Gorbi, S., & Regoli, F. (2018). Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine environmental research*, 140, 41–60.

Mezzelani, M., Fattorini, D., Gorbi, S., Nigro, M., & Regoli, F. (2020). Human pharmaceuticals in marine mussels: Evidence of sneaky environmental hazard along Italian coasts. *Marine Environmental Research*, 162, 105137.

Mezzelani, M., Nardi, A., Bernardini, I., Milan, M., Peruzza, L., d'Errico, G., Fattorini, D., Gorbi, S., Patarnello, T., & Regoli, F. (2021). Environmental pharmaceuticals and climate change: The case study of carbamazepine in *M. galloprovincialis* under ocean acidification scenario. *Environment international*, 146, 106269.

Mijangos, L., Ziarrusta, H., Ros, O., Kortazar, L., Fernández, L. A., Olivares, M., Zuloaga, O., Prieto, A., & Etxebarria, N. (2018). Occurrence of emerging pollutants in estuaries of the Basque Country: Analysis of sources and distribution, and assessment of the environmental risk. *Water research*, 147, 152–163.

- Miller, T. H, Ng, K. Tiong, Bury, S. T, Bury, S. E, Bury, N. R, & Barron, L. P. (2019). Biomonitoring of pesticides, pharmaceuticals and illicit drugs in a freshwater invertebrate to estimate toxic or effect pressure. *Environment international*, 129, 595-606.
- Moore M.N., Allen J.I. (2002) A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 54, 579-584.
- Moreno-González, R., Rodriguez-Mozaz, S., Gros, M., Barceló, D., & León, V. M. (2015). Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a Mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environmental research*, 138, 326–344.
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Huerta, B., Barceló, D., & León, V. (2016). Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon?. *Environmental research*, 146, 282-298.
- Mosca F., Gioia L., Narcisi V., Marozzi S., Tiscar P. G. (2005). Studio comparato mediante citometria a flusso, microscopia confocale e fluorimetria in micrometodo della fagocitosi in emociti di *Mytilus galloprovincialis*. *Ittiopatologia*, 2, 145-154.
- Mulder M., Antakyali D., Ante S. (2015). Costs of removal of micropollutants from effluents of municipal Wastewater Treatment Plants - General cost estimates for the Netherlands based on implemented full scale post treatments of effluents of Wastewater Treatment Plants in Germany and Switzerland. STOWA and Waterboard the Dommel pp. 1-55
- Nam S-W., Yoon Y., Chae S., Kang J-H., & Zoh K-D. (2017). Removal of selected micropollutants during conventional and advanced water treatment processes. *Environmental Engineering Science*, 34, 752-761.
- Nardi, A., Mincarelli, L.F., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Regoli, F., 2017. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 169, 493–502.
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., & Dong, H. (2020). Biological uptake, depuration and biochemical effects of diclofenac and carbamazepine in *Carassius carassius*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 205, 111106.

- Oliveira, P., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Wrona, F. J., Soares, A. M.V.M, Figueira, E., & Freitas, R. (2017). Physiological and biochemical alterations induced in the mussel *Mytilus galloprovincialis* after short and long-term exposure to carbamazepine. *Water research*, 117, 102-114.
- Parisi, M. G., Li, H., Jouvét, L. B., Dyrinda, E. A., Parrinello, N., Cammarata, M., & Roch, P. (2008). Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish & shellfish immunology*, 25(6), 834–840.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A. (2010) Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, 79(5), 489-498.
- Parolini, M., Binelli, A., & Provini, A. (2011). Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(6), 1586–1594.
- Peakall D.B. and Shugart L.R. (1993) Biomarkers: research and application in the assessment of environment health. *NATO ASI, Springer – Verlag Berlin Heidelberg*, H68, 31-48.
- Peake B.M., Braund R., Tong A.Y.C., Tremblay L.A. (2016). The Life-cycle of Pharmaceuticals in the Environment. *Woodhead Publishing Series in Biomedicine*, Number 51.
- Pereira, A. M.P.T, Silva, L. J.G, Meisel, L. M, Lino, C. M, & Pena, A. (2015). Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment. *Environmental Research*, 136, 108-119.
- Piedade, F., Bio, S., & Nunes, B. (2020). Effects of common pharmaceutical drugs (paracetamol and acetylsalicylic acid) short term exposure on biomarkers of the mussel *Mytilus* spp. *Environmental toxicology and pharmacology*, 73, 103276.
- Pipe, R. K., Farley, S. R., & Coles, J. A. (1997). The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and tissue research*, 289(3), 537–545.

- 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, 657-663.
- Regoli F., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., Focardi S., Winston G.W. (2002) Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research* 54, 419-423.
- Regoli F., Abbiati M., Maccaferri S. (2011). Principi e metodi per la caratterizzazione di sedimenti contaminati ai fini dell'analisi di Rischio Ecologico.
- Regoli, F., & Giuliani, M. Elisa. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine environmental research*, 93, 106-117.
- Reichwaldt, E., & Ghadouani, A. (2016). Can mussels be used as sentinel organisms for characterization of pollution in urban water systems? *Hydrology and Earth System Sciences*, 20(7), 2679-2689.
- Santos, L. H., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 175(1-3), 45-95.
- Sauvé, G., Malla, A., Joober, R., Brodeur, M. B., & Lepage, M. (2018). Comparing cognitive clusters across first- and multiple-episode of psychosis. *Psychiatry research*, 269, 707-718.
- Serra-Compte, A., Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2017). Multi-residue method for the determination of antibiotics and some of their metabolites in seafood. *Food and chemical toxicology*, 104, 3-13.
- Steinert, S., Streib-Montee, R., Leather, J., & Chadwick, D. (1998). DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation research*, 399 1, 65-85.

Swedish Environmental Protection Agency Report 6766. (2018). Advanced Wastewater Treatment for Separation and Removal of Pharmaceutical Residues and Other Hazardous Substances - Needs, Technologies and Impacts.

Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J., & Siah, A. (2013). Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Developmental and comparative immunology*, 39, 419-429.

Teixeira, M., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Wrona, F. J., Soares, A. M.V.M, Figueira, E., & Freitas, R. (2017). Toxic effects of the antihistamine cetirizine in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Water research*, 114, 316-326.

Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers 1 Dedicated to Professor Dr. Klaus. *Water Research*.

Tomasello, B., Copat, C., Pulvirenti, V., Ferrito, V., Ferrante, M., Renis, M., Sciacca, S., & Tigano, C. (2012). Biochemical and bioaccumulation approaches for investigating marine pollution using Mediterranean rainbow wrasse, *Coris julis* (Linneaus 1798). *Ecotoxicology and environmental safety*, 86, 168-75.

Tsiaka, P., Tsarpali, V., Ntaikou, I., Kostopoulou, M. N, Lyberatos, G., & Dailianis, S. (2013). Carbamazepine-mediated pro-oxidant effects on the unicellular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology*, 22, 1208-1220.

Viarengo, A., Canesi, L., Martinez, P.G., Peters, L.D., & Livingstone, D.R. (1995). Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 111, 119-126.

Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., 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. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 146(3), 281–300.

Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., & Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater

from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56(6), 583–592.

Wennmalm, A., & Gunnarsson, B. (2009). Pharmaceutical management through environmental product labeling in Sweden. *Environment international*, 35(5), 775–777.

Wille, K., Kiebooms, J. A., Claessens, M., Rappé, K., Vanden Bussche, J., Noppe, H., Van Praet, N., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C. R., De Brabander, H. F., & Vanhaecke, L. (2011). Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(5), 1459–1472.

Wootton, E. C., & Pipe, R. K. (2003). Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. *Fish & shellfish immunology*, 15(3), 249–262.

Xie, Z., Lu, G., Yan, Z., Liu, J., Wang, P., & Wang, Y. (2017). Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake. *Environmental pollution* (Barking, Essex : 1987), 222, 356–366.

Zheng S, et al. (2011). Antibiotics pollution in Jiulong River estuary: source, distribution and bacterial resistance. *Chemosphere* 84, 1677–1685.

Zhu, S., Dong, B., Wu, Y., Bu, L., & Zhou, S. (2019). Degradation of carbamazepine by vacuum-UV oxidation process: Kinetics modeling and energy efficiency. *Journal of hazardous materials*, 368, 178–185.

Zimmermann, S. G., Wittenwiler, M., Hollender, J., Krauss, M., Ort, C., Siegrist, H., & von Gunten, U. (2011). Kinetic assessment and modeling of an ozonation step for full-scale municipal wastewater treatment: micropollutant oxidation, by-product formation and disinfection. *Water research*, 45(2), 605–617.

Zou, H., Radke, M., Kierkegaard, A., MacLeod, M., & McLachlan, M. S. (2015). Using chemical benchmarking to determine the persistence of chemicals in a Swedish lake. *Environmental science & technology*, 49(3), 1646–1653.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., & Bagnati, R. (2007). Inquinamento da farmaci: Le evidenze (parte I). *Ricerca e Pratica*, 23(2), 67-73.