



### **Titolo del progetto:**

## **Rivelazione e caratterizzazione di inquinanti tossici in acqua di mare ed animali marini**

**Periodo di riferimento:** Gennaio 2007 - dicembre 2015

### **INTRODUZIONE GENERALE**

È di grande interesse per l'opinione pubblica la tematica relativa all'inquinamento ambientale con particolare riguardo all'inquinamento delle acque costiere marine da metalli pesanti ed idrocarburi policiclici aromatici per l'impatto enorme che la presenza di queste sostanze tossiche può avere sulla salute dell'uomo, sia mediante contatto diretto con l'acqua sia per contatto indiretto attraverso il consumo di pesce e molluschi di vario genere.

#### *Mercurio e derivati nell'acqua di mare.*

Tra i metalli pesanti il mercurio è tra le sostanze più velenose presenti in natura e sul nostro pianeta. Il mercurio è un metallo che esiste in diverse forme chimiche ed è rilasciato nell'ambiente sia da fonti naturali che artificiali e si ritrova quindi in aria, acqua e suolo. Una volta rilasciato, subisce una serie di trasformazioni complesse e fa parte di diversi cicli tra atmosfera, oceani e terra. Le tre forme chimiche del mercurio sono: mercurio elementare o metallico, mercurio inorganico (prevalentemente ione  $Hg^{2+}$ ) e mercurio organico. Il metilmercurio è la forma più comune di mercurio organico, la più tossica, ed è presente nella catena alimentare e si accumula principalmente in pesci, crostacei e animali che si nutrono di pesce. La principale fonte di contaminazione per l'uomo da mercurio è rappresentata dal cibo, senza considerare le centrali termoelettriche che bruciano carbone, acciaierie, impianti industriali, miniere e inceneritori di rifiuti. Vi è anche un'immissione naturale di mercurio in mare dovuta all'azione degli agenti atmosferici sulle rocce mercurifere ed alle attività vulcaniche, che viene valutata in migliaia di tonnellate all'anno (*Lindqvist OA, Jernelov K, Johansson K, Rohde H. 1984. Mercury in the Swedish environment – global and local sources. Swed. Environ. Prot. Board, SNV PM 1816, Stockholm, 105 pp*). Secondo le ultime stime (*Mason RP, Fitzgerald WF, Morel FMM. The biogeochemical cycling of elemental mercury - anthropogenic influences. Geochim Cosmochim Acta. 1994;58:3191–3198*) le emissioni naturali totali si aggirano attorno alle 1600 tonnellate annue. In particolare il Mare Mediterraneo è al centro di un'area sede del 65% delle riserve mondiali di mercurio (*Ferrara R, Maserti BE, Anderson M, Edner H, Ragnarson P, Svanberg S. 1997. Mercury degassing rate from mineralized areas in the Mediterranean basin. Water, Air and Soil Pollution. 93: 59–66*), di conseguenza i pesci del Mediterraneo mostrano livelli più elevati di contaminazione da mercurio rispetto a quelli provenienti da altri mari. I pesci a più alta concentrazione di mercurio sono i grandi predatori (tonno, pescespada, squalo, verdesca) che, essendo ai vertici della catena alimentare, tendono ad accumulare maggiori quantità di sostanze tossiche. Di conseguenza, i pesci di piccola taglia e i molluschi risultano più sicuri per il consumo alimentare. Le specie ittiche eliminano molto lentamente il mercurio assorbito. I tempi di dimezzamento del metilmercurio, se gli organismi marini esposti vengono spostati in aree non contaminate, vanno da 6 mesi per i mitili a 2 anni per il luccio.



L'accumulo nei pesci è maggiore nel tessuto muscolare rispetto a quello adiposo e circa il 90% del mercurio presente nei pesci si trova sotto forma di metilmercurio (*Guandalini E and Mantovani A, 1988. Il metilmercurio nei prodotti ittici. Ambiente, Risorse e Salute, 88: 7-12*).

La contaminazione del pesce da mercurio avviene attraverso tre distinti processi: bioconcentrazione, bioaccumulo e biomagnificazione.

La bioconcentrazione è il risultato di un'assunzione diretta di questa specie chimica dall'acqua attraverso la membrana delle branchie.

Il bioaccumulo rappresenta la combinazione dell'assunzione di mercurio direttamente dall'acqua e indirettamente attraverso l'ingestione di cibo.

La biomagnificazione consiste nell'aumento della concentrazione della specie chimica nei livelli più alti della catena alimentare.

Il mercurio rappresenta un potente e pericoloso inquinante che non è più considerato come un problema locale o regionale, ma mostra tutte le caratteristiche di un inquinante globale (*Schroeder, W. H. & Markes, J. J. 1994. Great Lakes Res. 20, 240-259*). La legislazione italiana, in attuazione di una direttiva comunitaria (*Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea, 1991*), fissa un livello massimo di 0.5 mg Kg<sup>-1</sup> nelle parti commestibili dei prodotti della pesca. Il Comitato congiunto FAO-WHO ha stabilito un limite provvisorio tollerabile di assunzione settimanale per il mercurio totale pari a 0.3 mg per un adulto di 60 Kg.

I gruppi di popolazione particolarmente interessati o a rischio di esposizione al mercurio includono le donne in gravidanza o che allattano, e i bambini. Questa sostanza è in grado di superare la barriera cerebrale e quella placentare causando danni a carico del sistema nervoso centrale e dello sviluppo del feto: alte dosi causano ritardo mentale grave del nascituro, dosi più basse provocano alterazioni dello sviluppo psicomotorio. Tra i sintomi legati all'esposizione cronica ci sono le alterazioni della funzionalità renale, della memoria, problemi motori e della coordinazione. È documentata l'associazione tra l'esposizione al metilmercurio e le malattie cardiovascolari (*JECFA, 2007*) anche se è noto l'effetto benefico del consumo di pesce (presenza di acidi grassi omega 3) che contrasterebbe l'azione del metilmercurio sul sistema cardiovascolare. Un'azione di contrasto è svolta anche dal selenio presente nell'ambiente o negli alimenti.

La chimica biologica del mercurio è caratterizzata dall'elevata affinità dei composti mercuriali per i gruppi tiolici, dall'alta stabilità del suo legame con il carbonio e dall'elevata solubilità, rispetto agli altri metalli, nell'acqua e nei solventi organici; inoltre i vapori di mercurio elementare ed il metilmercurio possono attraversare facilmente le membrane biologiche e provocare conseguenze dal punto di vista tossicologico.

Nonostante le emissioni antropiche di mercurio siano state drasticamente ridotte a partire dal 1960, il mercurio si sta ancora diffondendo nell'ambiente e sebbene il metilmercurio rappresenti la forma chimica dominante nella maggior parte degli organismi che fanno parte dei gradini più alti della piramide alimentare, esso costituisce solo una piccola frazione del mercurio totale presente in un ecosistema acquatico (*Lindqvist OA, Jernelov K, Johansson K, Rohde H. 1984. Mercury in the Swedish environment – global and local sources. Swed. Environ. Prot. Board, SNV PM 1816, Stockholm, 105 pp*).

È presente un'ampia variazione di concentrazione di mercurio totale nelle acque naturali (0.3-15 ng L<sup>-1</sup>) in relazione al luogo (sia geografico, che con riferimento alla distanza dalla costa), alla



profondità, alla quantità di materia organica presente.

Del mercurio totale fanno parte la frazione disciolta (definita come il mercurio presente in un campione filtrato con un filtro di porosità di  $0.45 \mu\text{m}$ ) e quella associata al materiale particellato in sospensione. Seritti et al., (*Ferrara R., Seritti A., Barghigiani C., Petrosino A., Mercury levels in the dissolved and particulate fractions of the Tyrrhenian sea. Marine Chemistry, 18(2-4):227-232.*) hanno trovato per il Mar Mediterraneo valori compresi nell'intervallo  $0.3-8.0 \text{ ng L}^{-1}$  di mercurio legato al particellato, e  $1.7-12.2 \text{ ng L}^{-1}$  di mercurio nella fase disciolta.

È difficile determinare l' $\text{Hg}^{2+}$  libero disciolto nelle acque naturali (definito come mercurio reattivo), sia per le sue basse concentrazioni ( $0.05-0.1 \text{ ng L}^{-1}$  Mar Adriatico, *Horvat M., 2001, Mercury, do we know enough? In: Ebdon L., Pitts L., Cornelis R., Crews H., Donards OFX., Ouevauviller P., editors. Trace Elements speciation for environment, food and health. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry, p 127-141*), sia per la presenza in acqua di molecole e ioni capaci di legare l' $\text{Hg}^{2+}$  in maniera più o meno forte.

#### *Mercurio e derivati nei pesci e nei molluschi.*

I cefalopodi – seppie, calamari e polpi – rappresentano una rilevante quota nel mercato di prodotti ittici in Mediterraneo, Europa e nel resto del Mondo. Queste specie, tutti predatori, si posizionano ai vertici della catena alimentare e rappresentano pertanto una importante fonte di “contaminanti” nella nostra dieta.

Diversi studi hanno dimostrato che i cefalopodi hanno la capacità di accumulare elementi in traccia ad alti livelli nei loro tessuti (e.g.: 1-7). Ciò porta ad una maggiore attenzione per i rischi sulla salute umana connessi al consumo di carne di cefalopodi (e.g.: 8-10).

Nella gran maggioranza di specie di cefalopodi con interesse commerciale, nel corso della storia vitale gli animali migrano da acque più profonde a quelle costiere, nel corso della stagione riproduttiva, dove essi depositano le uova che – come conseguenza – sono maggiormente esposte a contaminanti costieri. Le uova si sviluppano, quindi, in un ambiente che è esposto ad attività antropiche più intense e con maggiore esposizione a vari contaminanti, quali metalli pesanti, o metaboliti di sostanze chimiche di sintesi impiegate nei farmaci tra cui quelli ad azione psico-attiva (11-12).

Gli embrioni cefalopodi sono quindi esposti a elementi in traccia disciolti nell'acqua del mare durante il loro sviluppo, fase che rappresenta circa il 10-15% della durata della vita di una specie di cefalopode. Studi recenti (13) hanno dimostrato che nel caso delle uova di seppia – caratterizzate da “gusci” e corion resistenti – i fattori di concentrazione risultano essere relativamente bassi, indipendentemente dalla durata dell'esposizione sperimentale. In contrasto, le uova di Octopus, che sono protette esclusivamente dalla membrana corionale, accumulano grandi livelli di metalli in traccia sia direttamente sia attraverso l'assunzione di quello derivato dal consumo di vitello. L'accumulo di metalli in traccia nei tessuti degli animali hanno effetto diretto durante l'embriogenesi, ma risultano manifestare vari effetti tossici sulle fasi giovanili (review in 13). Risulta evidente che tali effetti hanno un impatto durante tutto lo sviluppo dell'animale, e possono risultare particolarmente critici per il successo del “reclutamento” della popolazione di tali specie. I ricci di mare, in particolare la specie *Paracentrotus lividus* rappresentano un alimento prelibato della dieta Mediterranea e pertanto



possono essere una potenziale fonte di contaminazione da mercurio. Ciò nonostante si sa molto poco dei livelli di contaminazione da mercurio nei ricci. Poiché quest'organismo è stato usato per molti anni come modello per studi sullo sviluppo embrionale e larvale, si sa che questi stadi sono particolarmente sensibili alla presenza di contaminazione da metalli pesanti, incluso il mercurio, con potenziali effetti negativi sul reclutamento ad adulto.

*Altri inquinanti: Benzo(a)pirene, idrocarburi policiclici aromatici in generale.*

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono un gruppo di contaminanti organici formati nella combustione incompleta degli idrocarburi, quali carbone e benzine. Gli IPA costituiscono un grosso problema di impatto ambientale dovuto alle attività antropiche che implicano combustioni, essendo tossici, soprattutto per la vita marina ed essendo carcinogenici e mutagenici. La tossicità degli IPA dipende dalla struttura molecolare della singola specie. A seconda della specie molecolare considerata si va da composti non tossici ad altri estremamente tossici. Il benzo(a)pirene [acronimo B(a)P] è noto per essere stato il primo composto chimico di cui si è dimostrata la natura carcinogena. L'agenzia per la protezione ambientale del governo degli Stati Uniti, EPA, ha classificato sette IPA come probabili agenti carcinogeni per l'essere umano: benzo(a)anthracene, benzo(a)pirene, benzo(b)fluorantene, benzo[k]fluorantene, crisene, dibenzo(a,h)antracene, indeno(1,2,3-cd)pirene.

Sebbene gli IPA siano normalmente presenti in natura, il loro accumulo è causato soprattutto da attività umane, tra le quali eminentemente alcune attività industriali.

L'Unione Europea sta sviluppando politiche e strategie tese alla protezione dell'ambiente da alcune delle attività industriali a forte impatto ambientale e soprattutto dalla loro dismissione. A tale scopo sono stati promossi e messi a punto azioni e protocolli di monitoraggio in tempo reale dei siti a forte impatto e loro bonifica. La legislazione europea (2000/60/CE; 2007/60/CE; 2008/56/CE; 2013/179/UE; 2006/1907/CE) mira a promuovere attività ed azioni di vario tipo allo scopo di monitorare e proteggere la qualità delle acque marine, di attenuare i fattori di impatto dovuti alle attività antropiche e soprattutto le loro conseguenze sulla salute umana e a preservare l'habitat marino. Come risultati dei processi di industrializzazione e urbanizzazione la massiccia produzione di prodotti e bioprodotto legati a queste attività ha sensibilmente alterato l'equilibrio naturale e compromesso l'ambiente, in modo particolare quello marino attraverso il rilascio nelle acque circostanti di massicce quantità di metalli e di IPA derivati dalla combustione di combustibili fossili, di scarichi industriali ed altro. Di recente l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) ha rivelato un incremento dei livelli di IPA anche in molluschi e alcune specie di pesci dell'area, a riprova dell'impatto di questi contaminanti nella catena alimentare.

Gli IPA possono produrre effetti tossici nelle specie marine e, quindi, avere un pesante impatto sull'ecosistema marino e, quindi, sulla salute umana.

In questo contesto, è di particolare rilevanza anche monitorare le reazioni biologiche innescate a seguito di trattamenti con estratti di frutti e piante cresciute a ridosso di bacini idrici contaminati, per stabilire una correlazione tra le sostanze presenti e le eventuali attività tossiche. Gli esperimenti in questo caso possono essere condotti su linee cellulari su cui vengono monitorati alcuni markers molecolari oppure processi di morte cellulare indotta dalle sostanze in particolari condizioni di trattamento e concentrazione.



## OBIETTIVI

In questo contesto le unità di ricerca dell'area napoletana che hanno partecipato allo svolgimento di questo progetto: Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR (CNR-IBB), Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale (SUN-DBBPG), Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche della Seconda Università degli Studi Napoli (SUN-DISTABIF), Stazione Zoologica Anton Dohrn (SZN) e Dipartimento di Fisica dell'Università Federico II di Napoli (UNINA-DIPFIS), hanno svolto attività di ricerca focalizzate sulla messa a punto di metodi biochimici, biofisici e biologici per la determinazione sia del mercurio che di alcuni IPA, in acqua di mare o in matrici che ne mimano la composizione. Inoltre le unità hanno lavorato alla caratterizzazione delle proprietà tossicologiche del mercurio in ricci di mare e copepodi nonché alla raccolta di dati analitici di concentrazione di mercurio e derivati di mercurio in molluschi per la caratterizzazione dei livelli di bio-accumulo di metalli in traccia e di sostanze derivate dall'attività umana allo scopo di individuare le eventuali possibili ricadute sul benessere animale e non da ultimo sulla "biosicurezza".

Sulla base di tali premesse, il progetto di ricerca era orientato al raggiungimento dei seguenti **obiettivi**:

1. Messa a punto di metodi analitici per la determinazione di  $Hg^{2+}$  in campioni di acqua di mare o di acqua di mare sperimentale oppure nei tessuti di pesci e molluschi destinati al consumo. Quest'obiettivo era di pertinenza di: CNR-IBB, SUN-DISTABIF.
2. Progettazione, sviluppo e realizzazione di un sensore portatile, di costo contenuto e altamente specifico per la rivelazione del B(a)P in fase liquida in tempo reale, potenzialmente estendibile anche alla rivelazione di altri IPA. Quest'obiettivo era di pertinenza di UNINA-DIPFIS. L'obiettivo finale non era limitato alla sola applicazione tecnologica e allo sviluppo sperimentale del nuovo dispositivo di rilevazione, ma mirava anche a definire lo stato di salute dell'ambiente marino campano e gli effetti dell'inquinamento da idrocarburi su sistemi biologici complessi.
3. Valutazione della tossicità del mercurio e altri metalli pesanti su organismi marini di rilevanza ecologica (copepodi e riccio di mare). Valutazione della concentrazione effettiva (EC50), definita come concentrazione di contaminante che induce la morte del 50% degli embrioni e delle larve di riccio di mare. Individuazione di biomarkers molecolari da utilizzare in studi ecotossicologici.
4. Determinazione delle reazioni biologiche innescate a seguito di trattamenti con estratti di frutti e piante cresciute a ridosso di bacini idrici contaminati. Quest'obiettivo era di pertinenza di SUN-DBBPG.



5. Raccolta di dati analitici di concentrazione di mercurio e derivati di mercurio per la caratterizzazione dei livelli di bio-accumulo di metalli in cefalopodi. Quest'obiettivo era di pertinenza di SZN.

### **Obiettivo 1**

Attività svolte dall'istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR (**IBB-CNR**) e dal Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche dell'Università Federico II di Napoli (**SUN-DISTABIF**).

### **INTRODUZIONE**

Il mercurio è tra le sostanze più velenose presenti in natura e sul nostro pianeta. Esso esiste in diverse forme chimiche ed è rilasciato nell'ambiente (aria, acqua e suolo) da varie fonti naturali e artificiali. Le tre forme chimiche del mercurio sono: mercurio elementare o metallico, mercurio inorganico (prevalentemente ione  $Hg^{2+}$ ) e mercurio organico. Il Mercurio inorganico, sotto forma di ione divalente, può essere rivelato attraverso vari metodi analitici che implicano però l'impiego di strumentazione sofisticata e costosa quali assorbimento atomico o spettrometri di massa ICP, scarsamente utilizzabili per analisi *in situ*. Utilizzando dei probes a base gruppi tiolici o simili legati a fluorofori, è ipotizzabile l'impiego di sonde organiche o bio-organiche che, complessando ad alta affinità ed in maniera altamente specifica ioni  $Hg^{2+}$ , possano funzionare come sensori colorimetrici o fluorimetrici della presenza del metallo. Metodi spettroscopici per la determinazione del mercurio divalente in acqua sono stati ampiamente descritti; tuttavia la loro trasferibilità in campioni di acqua marina è complicata dalla presenza di alti ioni metallici interferenti che possono complessare le bio-sonde e da elevate concentrazioni di ioni cloruro che, nonostante la più bassa affinità, complessano gli ioni metallici sottraendolo dai complessi con le bio-sonde. Eventuali sonde per mercurio divalente che funzionano complessando lo ione metallico in presenza di elevate concentrazioni di ioni cloruro ed altri interferenti metallici, cambiando le loro proprietà spettroscopiche, sarebbero estremamente semplici da usare, facilmente trasferibili ad applicazioni di determinazioni qualitative e quantitative in siti marini e molto poco costose. Le applicazioni previste per questi probes sono la determinazione di ioni  $Hg^{2+}$  in concentrazioni fino ad 1 ppm, in acque di transizione, ovvero in acque salmastre, originate dal mescolamento tra acque costiere e acque dolci dei fiumi, quali lagune, stagni costieri e laghi salmastri e zone di delta ed estuario.

### **Obiettivo di IBB-CNR e SUN-DISTABIF.**

L'obiettivo principale dei soggetti IBB-CNR e SUN-DISTABIF era la messa a punto di metodi analitici per la determinazione di  $Hg^{2+}$  in campioni di acqua di mare o di acqua di mare sperimentale in concentrazione al di sotto di 1 ppm, utilizzando biosonde sintetiche progettate per complessare ioni mercurio divalenti in presenza di altri ioni interferenti e delle elevate concentrazioni di ioni cloruro presenti nell'acqua di mare. Il team si è occupato della progettazione, preparazione e caratterizzazione analitica e spettroscopica di tali biosonde in complesso con ioni  $Hg^{2+}$ . Sono state inoltre studiati dei probes commerciali per misure spettrofotometriche e spettrofluorimetriche direttamente in acqua di mare.

### **RISULTATI/REALIZZAZIONI/PRESTAZIONI FUNZIONALI SPECIFICHE QUANTITATIVE.**

Sono stati realizzati dei probe fluorescenti basate su molecole di dansil-metionina in grado di rivelare la presenza di  $Hg^{2+}$  in campioni acquosi fino alla concentrazione di circa 0.12 ppm ed in presenza di



vari altri ioni metallici interferenti. Le misure qualitative e quantitative sono state eseguite sia su soluzioni acquose tamponate (soluzioni semplici) e soluzioni mimanti l'acqua di mare (acqua di mare sperimentale). Le misure sono state eseguite sia con spettrofluorimetri da laboratorio sia con sistemi sperimentali portatili per misure in situ.

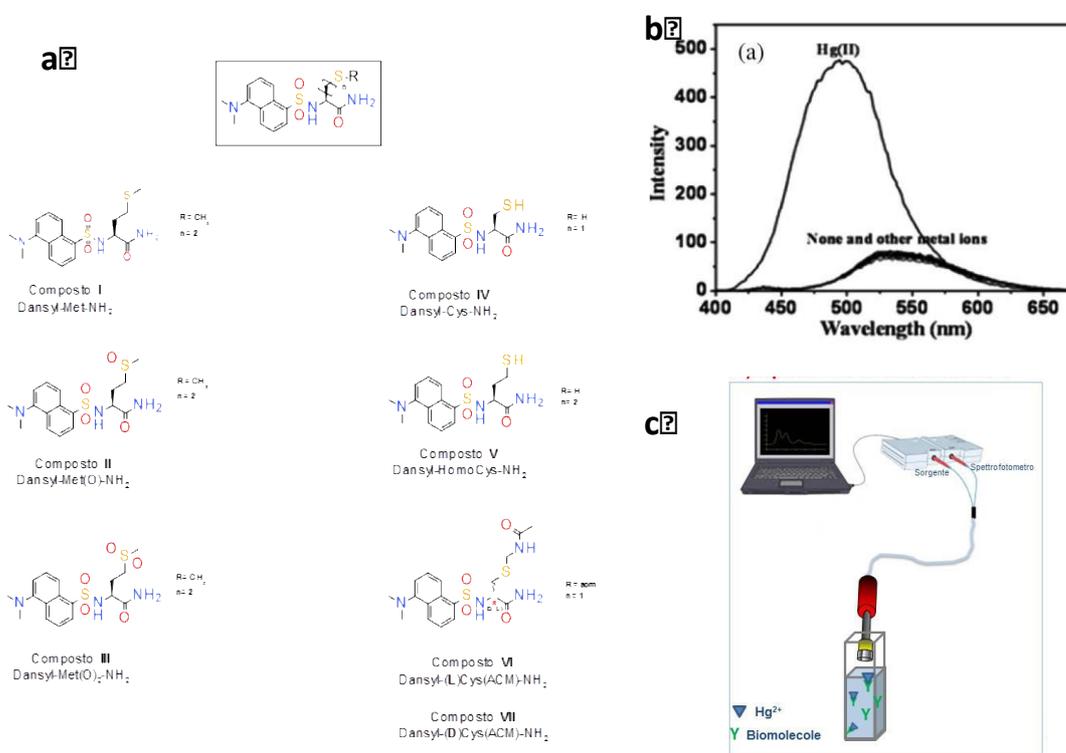
Le performances dei bioprobes in campioni di acqua di mare sperimentale non sono altrettanto buone. Sono state progettate e realizzate altre biosonde a base di molecole di Bodipy che soddisfano invece in pieno tali requisiti rivelando  $Hg^{2+}$  in un range di concentrazioni tra 0 e 8 ppb in acqua di mare. I risultati sono riportati di seguito in forma riassuntiva ed in forma estesa negli allegati Report 1 (Rapporto Tecnico 1) e Report 2 (Rapporto Tecnico 2)

## METODO

Il primo set di molecole progettate, realizzate e caratterizzate in questo progetto sono riassunte nella Fig. 1a. Esse sono state progettate a partire dalla molecola capostipite denominata Dansyl-L-Met- $NH_2$ , dove Dansyl corrisponde al gruppo fluorescente Dansile che modula e rende selettivo il riconoscimento dei cationi metallici mediante complessazione con il gruppo sulfonammidico. Il riconoscimento si traduce in variazioni delle proprietà spettroscopiche (fluorescenza ed assorbanza) del dansile stesso e tali variazioni sono poi sfruttate per la messa a punto di saggi analitici in cui è possibile seguire la risposta dei sensori mediante misure di fluorescenza ed assorbanza.

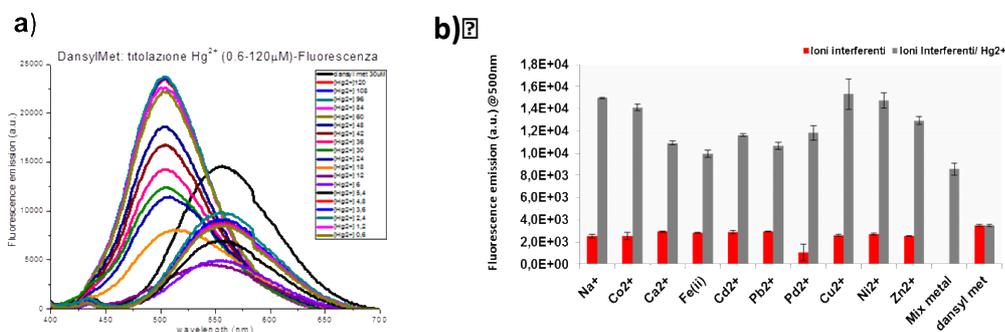
Dansyl-L-Met- $NH_2$  (anche Dansyl-Met) è in grado di legare selettivamente lo ione mercurio in acqua con un meccanismo "turn-on" (aumento di fluorescenza, vedere Fig. 1b) mentre lega altrettanto selettivamente lo stesso ione in solventi organici o misti organico-acquoso (acqua-acetonitrile 1:1) con un meccanismo invertito di "turn-off" (spegnimento della fluorescenza). L'ipotesi di maggiore stabilità è basata sulla struttura della molecola, sulle ridotte dimensioni e sulla generale elevata stabilità di aminoacidi in soluzioni acquose. Per ottenere bioprobes adatti a determinazioni di  $Hg^{2+}$  anche in acqua di mare sono state sintetizzate nuove biosonde a base di BODIPY per la rivelazione specifica dello ione  $Hg^{2+}$ . I derivati del BODIPY sono molecole fluorescenti che tendono ad avere un forte assorbimento nell'UV e sono caratterizzate da picchi di emissione in fluorescenza ben definiti e con alte rese quantiche. Tali derivati sono stabili in condizioni fisiologiche e piccole modifiche delle loro strutture consentono di modulare le loro caratteristiche di fluorescenza. Nel nostro caso abbiamo preso in considerazione il derivato bodipy-amminofenolo (VIII), altamente selettivo e sensibile per il catione  $Hg^{2+}$  (Fig. 3a).

## RISULTATI OTTENUTI



**Figura 1. a:** struttura delle biomolecole disegnate e caratterizzate. **b:** spettro di emissione in fluorescenza di I ( $\lambda_{exc} = 380$  nm) in tampone 10 mM HEPES pH 7.4, in presenza di ioni  $Hg^{2+}$  e di altri metalli, inclusi  $Hg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ag^{+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $K^{2+}$ . **c:** schema del sistema impiegato per l'operatività diretta in situ di misure di spettri di assorbimento e di fluorescenza direttamente in campioni di acqua normale o marina.

I derivati della dansyl metionina progettati e preparati, riportati in Figura 1, differenti per lunghezza della catena laterale amminoacidica e tipo di sostituenti su S-terminale (zolfo terminale) sono stati studiati per valutare gli effetti di tali modifiche sulle proprietà di complessazione di  $Hg^{2+}$ , sulla selettività di tale complessazione e sulle rispettive costanti di dissociazione (KD). A corredo della progettazione delle biomolecole, sono stati anche valutati i possibili approcci tecnologici per l'impiego in situ di tali molecole con sensori in fibra ottica. La soluzione tecnologica individuata è basata sull'impiego di sensori in fibra ottica in grado di sfruttare le proprietà di binding selettivo e specifico delle molecole proposte con  $Hg^{2+}$  direttamente in soluzione acquosa. Il sensore in fibra ottica è in grado di registrare variazioni negli spettri di assorbimento e/o emissione in fluorescenza in seguito alla complessazione con il catione metallico direttamente in campioni di acqua in generale o di acqua marina (Fig. 1c). Tutte le molecole progettate e preparate sono state caratterizzate per legame ad  $Hg^{2+}$  determinando le relative KD di complessazione e la selettività rispetto ad altri metalli interferenti. Le KD sono riportate nella successiva Tabella 1. In Figura 2 sono riportati gli spettri di emissione e le prove di selettività relative al Composto I.



**Figura 2:** a) spettri di emissione in fluorescenza e b. emissione in fluorescenza del Composto I in presenza di ioni interferenti e miscele di ioni interferenti/Hg<sup>2+</sup> 1:1 registrata a 500 nm.

Per alcuni di questi derivati è anche possibile distinguere una diversa stechiometria di complessazione: associata, per basse concentrazioni di mercurio, allo spegnimento della fluorescenza e per più alte concentrazioni di mercurio all'accensione della fluorescenza.

BIOMOLECOLE	K <sub>d(1)</sub> (μM)	K <sub>d(2)</sub> (μM)	Note
Composto I -Dansyl Met	17	45	2 siti di complessazione
Composto II- Dansyl Met (O)	2	-	
Composto III- Dansyl Met (O) <sub>2</sub>	-	-	
Composto IV- Dansyl Cys	30		
Composto V- Dansyl Homocys	5		
Composto VI- Dansyl Cys (L)-ACM	10	36	2 siti di complessazione
Composto VII- Dansyl Cys (D)-ACM	30		

**Tabella 1.** Lista delle costanti di dissociazione determinate per i composti sintetizzati

I derivati I, II, V, VI risultano essere quelli più affini al mercurio. E' stato anche determinato il limite di sensibilità di tali molecole effettuando prove di titolazione in intervalli di concentrazione di Hg<sup>2+</sup> fino a circa 0.1 uM. La sensibilità di tali probes è risultata essere di circa **0.6 μM (0.12 ppm)** ottenuta con i composti I e VI, ovvero circa 8 volte al di sotto del limite desiderato di 1 ppm.

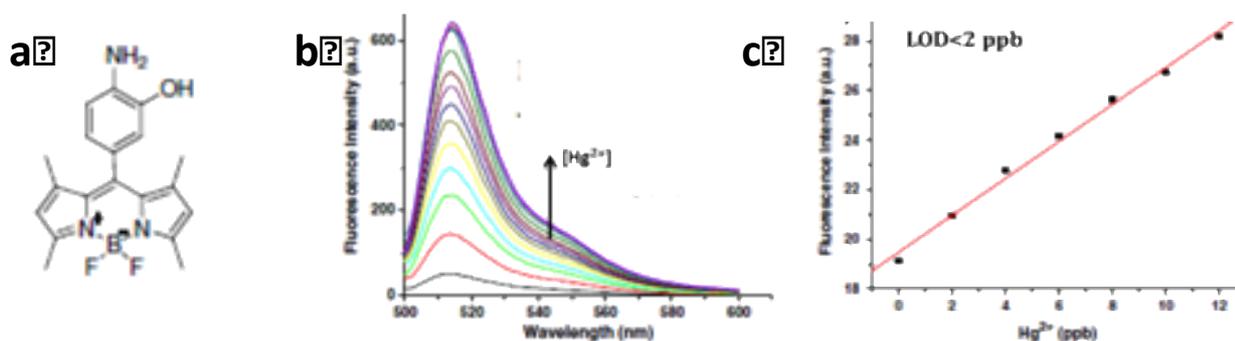
Dopo il completamento degli studi sulla sensibilità, è stato effettuato uno studio approfondito sulla selettività del riconoscimento di tale catione in presenza di cationi interferenti quali Ca<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Pd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> (soluzioni preparate a partire dai cloruri) e successivamente in acqua di mare sperimentale in un intervallo di concentrazioni vicino ad 1 ppm.

Gli studi di selettività hanno evidenziato come per il composto I ed il composto VI si abbia una interferenza non trascurabile sugli spettri di emissione in fluorescenza dovuta alla presenza dei cationi presi in esame alle basse concentrazioni. Particolare attenzione è stata rivolta all'effetto del catione Na<sup>+</sup> e dello ione cloruro, presenti in quantità elevate in ambiente marino. Tale effetto è stato valutato effettuando prove di selettività in acqua di mare sperimentale. Infatti, per completare il pannello di saggi di selettività delle molecole prescelte (composti I e VI), sono stati effettuati titolazioni di Hg<sup>2+</sup> in acqua di mare riprodotta in laboratorio (sperimentale). **La composizione dell'acqua di mare sperimentale utilizzata è la seguente: 0.6 M NaCl e 0.06 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.**



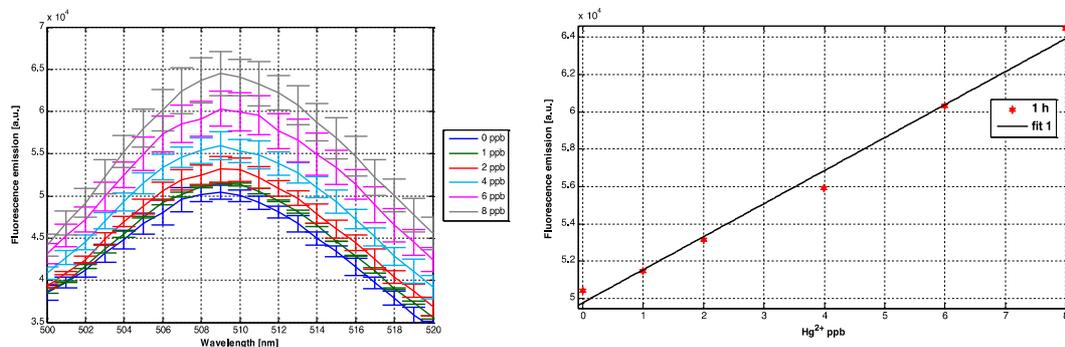
In acqua di mare sperimentale si osserva uno spegnimento della fluorescenza all'aumentare della concentrazione di  $\text{Hg}^{2+}$ . Probabilmente, per concentrazioni di NaCl così elevate (0.6 M), la presenza di sodio e di cloruri dà luogo ad equilibri di speciazione differenti che: i) possono interferire con la formazione del complesso  $\text{Hg}^{2+}$ /dansyl derivato; ii) possono interferire con il meccanismo di trasferimento elettronico responsabile dello shift e dell'accensione della fluorescenza. In acqua di mare sperimentale si osserva uno spegnimento della fluorescenza fino ad una concentrazione di  $\text{Hg}^{2+}$  pari a 4.8  $\mu\text{M}$  (1 ppm). A seguire, concentrazioni crescenti di  $\text{Hg}^{2+}$  generano il completo spegnimento della fluorescenza che si perde nel rumore di fondo della misure acquisite.

La risposta in fluorescenza del Dansy-(L)Cys-ACM, in presenza di  $\text{Hg}^{2+}$  e concentrazioni di cloruro di sodio elevate si discosta in modo rilevante da quella osservata nel buffer HEPES. I due bioprobes, quindi, sono adatti per la determinazione di mercurio divalente in soluzioni non marine fino a concentrazioni molto al di sotto di 1 ppm, ma in presenza di altri ioni metallici interferenti e di concentrazioni di sodio cloruro elevate il limite di rivelabilità è limitato ad 1 ppm. Gli stessi bioprobes non sembrano adatti alla determinazione diretta dello stesso ione mercurico in soluzioni che mimano l'acqua di mare a causa di interferenza delle elevate concentrazioni di ione cloruro ed eventualmente dello ione sodio.



**Figura 3. a:** struttura del BODIPY–amminofenolo (VIII). **b:** spettri di emissione in fluorescenza di VII ( $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ ) in tampone 10 mM HEPES pH 7.4, in presenza di concentrazioni crescenti di  $\text{Hg}^{2+}$ . **c:** variazioni di intensità di fluorescenza del BODIPY-amminofenolo (5  $\mu\text{M}$ ) in seguito ad aggiunta di  $\text{Hg}^{2+}$  (0-12 ppb) in tampone 10 mM HEPES pH 7.4.

Tale derivato è costituito da due unità: i) un core di BODIPY come molecola fluorescente; ii) l'amminofenolo che è in grado di formare un complesso stabile con  $\text{Hg}^{2+}$ . In presenza di concentrazioni crescenti di  $\text{Hg}^{2+}$  si ha un aumento della fluorescenza Fig. 3b), ed è stato riportato un LOD (limit of detection) inferiore a 2 ppb (Fig. 3c). Il BODIPY-amminofenolo è stato sintetizzato, purificato e caratterizzato presso i nostri laboratori. Successivamente sono state effettuate analisi di fluorescenza per verificare le proprietà spettroscopiche sia delle molecole isolate sia dei complessi con gli ioni  $\text{Hg}^{2+}$  (Vedere Fig. 3bc). Successivamente sono state eseguite misure per verificare la sussistenza delle stesse proprietà in acqua di mare sperimentale per cui sono state costruite rette di taratura in questa matrice nell'intervallo 0–8 ppb, scartando le concentrazioni al di sopra di questo intervallo che non rispettano un andamento lineare. In Fig. 4a è riportato uno zoom degli spettri di emissione in fluorescenza nell'intervallo  $\text{Hg}^{2+}$  0-8 ppb con relative deviazioni standard nell'intervallo preso in esame per l'elaborazione del fitting ed in Fig. 4b è riportata la relativa retta di taratura.



**Figura 4:** a: zoom della porzione di spettro di fluorescenza intorno al punto di massimo con le relative barre di errore per soluzioni di BODIPY-amminofenolo 5  $\mu\text{M}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ) in acqua di mare sperimentale con aggiunta di ioni  $\text{Hg}^{2+}$  con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 8 ppb. b. Retta di calibrazione relativa allo ione  $\text{Hg}^{2+}$  determinato misurando la fluorescenza del complesso con BODIPY-amminofenolo (5  $\mu\text{M}$ ) nel punto di massimo (picco a 510 nm;  $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ) in in acqua di mare nell'intervallo 0 – 8 ppb.

Sono stati quindi studiati un set di molecole a base di dansyl-metionina ed una molecola a base di BODIPY per verificare il loro impiego in misure di concentrazione di  $\text{Hg}^{2+}$  in soluzioni saline semplici e in una soluzione di acqua di mare sperimentale che mima la composizione salina dell'acqua marina. Lo studio ha dimostrato che il set di molecole a base di Dansyl-Met è adatto a determinare concentrazioni di  $\text{Hg}^{2+}$  in soluzioni semplici al di sotto di 1 ppm, mentre non è utilizzabile per le stesse misure in acqua mare. La molecola a base di BODIPY si presta a misure di concentrazioni di  $\text{Hg}^{2+}$  in acqua di mare fino a concentrazioni molto più basse, comprese tra 0 e 8 ppb.

## PRODOTTI REALIZZATI

1. Report 1 (Rapporto tecnico 1- Report di dettaglio sulla progettazione, preparazione e caratterizzazione analitica e funzionale delle biomolecole progettate e testate per il riconoscimento di ioni  $\text{Hg}^{2+}$  in ambienti acquosi marini o similari)
2. Report 2 (Rapporto tecnico 2 - Progettazione, preparazione e caratterizzazione analitica di un biosensore in fibra ottica operante in soluzione con le biomolecole descritte nel Rapporto Tecnico 1 per il riconoscimento di ioni  $\text{Hg}^{2+}$  in ambiente marino o in matrici acquose che mimano ambienti marini i.e. acqua di mare sperimentale o sintetica).

## Obiettivo 2

Attività svolte dal Dipartimento di Fisica (UNINA-DIPFIS) dell'Università Federico II di Napoli.

## INTRODUZIONE

Come risultato dei processi di industrializzazione e urbanizzazione la massiccia produzione di prodotti e bioprodotto legati a queste attività ha sensibilmente alterato l'equilibrio naturale e compromesso l'ambiente, in modo particolare quello marino attraverso il rilascio nelle acque circostanti di massicce quantità di metalli e di IPA derivati dalla combustione di combustibili fossili, di scarichi industriali ed altro. Di recente l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) ha rivelato un incremento dei livelli di IPA anche in molluschi e alcune specie di pesci dell'area, a riprova dell'impatto di questi contaminanti nella catena alimentare. Gli IPA possono produrre effetti tossici



nelle specie marine e, quindi, avere un pesante impatto sull'ecosistema marino e, quindi, sulla salute umana.

In questo contesto, è di particolare rilevanza anche monitorare le reazioni biologiche innescate a seguito di trattamenti con estratti di frutti e piante cresciute a ridosso di bacini idrici contaminati, per stabilire una correlazione tra le sostanze presenti e le eventuali attività tossiche. Gli esperimenti in questo caso possono essere condotti su linee cellulari su cui vengono monitorati alcuni markers molecolari oppure processi di morte cellulare indotta dalle sostanze in particolari condizioni di trattamento e concentrazione.

## OBBIETTIVO

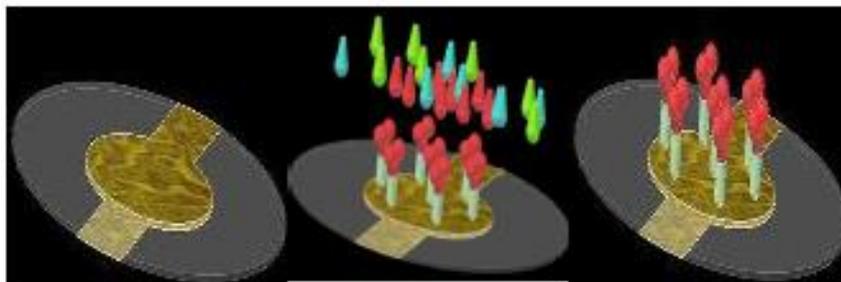
L'obiettivo del soggetto attuatore Università degli Studi di Napoli "Federico II" (Dipartimento di Fisica) è consistito in progettazione, sviluppo e realizzazione di un sensore portatile, di costo contenuto e altamente specifico per la rivelazione di un IPA leggero ed estremamente pericoloso quale il benzo(a)pirene [B(a)P] in fase liquida in tempo reale, potenzialmente estendibile anche alla rivelazione di altri IPA. L'obiettivo non si è limitato alla sola applicazione tecnologica e allo sviluppo sperimentale del nuovo dispositivo di rilevazione, ma ha mirato anche a definire lo stato di salute dell'ambiente marino campano e gli effetti dell'inquinamento da idrocarburi su sistemi biologici complessi. Alla realizzazione degli scopi dell'obiettivo ha concorso la sinergia sviluppata nella collaudata collaborazione con un altro soggetto attuatore del progetto, ovvero la Seconda Università degli Studi di Napoli (Dipartimento di Biochimica Biofisica e Patologia Generale).

## RISULTATI/REALIZZAZIONI/PRESTAZIONI FUNZIONALI SPECIFICHE QUANTITATIVE.

In definitiva l'apparato realizzato si è dimostrato in grado di fare sensing di IPA con un notevole incremento della sensibilità (circa 500-1000 volte) rispetto alla tecnica GC-MS richiedendo tempi di campionamento almeno 200 volte inferiori.

## METODO

Il metodo è consistito nell'utilizzo di un immunosensore basato sull'impiego di microbilance a cristalli di quarzo (QCM) funzionalizzate mediante deposizione di anticorpo anti-B(a)P sull'elettrodo d'oro del sensore, con una tecnologia altamente innovativa, messa a punto dal soggetto attuatore UNINA-DIPFIS), che si fonda su irraggiamento degli anticorpi anti-B(a)P con impulsi laser UV (260 nm) ultrabrevi. Una QCM è un sensore gravimetrico in grado di misurare con grande accuratezza la frequenza di vibrazione propria di un cristallo di quarzo. Quando all'elettrodo d'oro depositato sul cristallo di quarzo vengono attaccate delle molecole la frequenza di vibrazione del quarzo diminuisce a causa dell'accresciuta massa dell'elemento di misura. La specificità elevata della misura viene garantita dalla funzionalizzazione per mezzo di anticorpi che riconoscono e catturano solo il contaminante da rivelare. Il principio di funzionamento del sensore è mostrato in Figura 5.

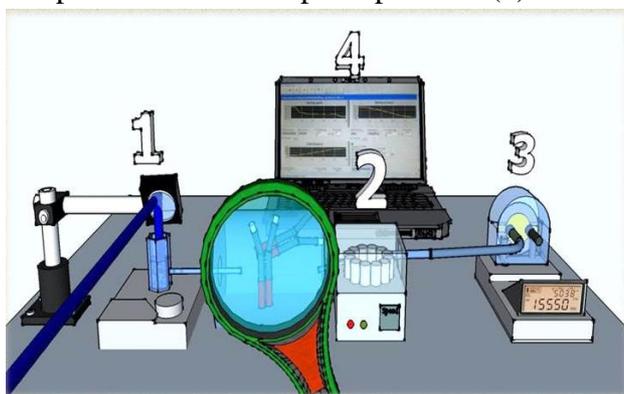


**Figura 5.** (Sinistra) QCM “nuda” in assenza di funzionalizzazione. (Destra) QCM funzionalizzata con anticorpi trattati con impulsi laser UV. (Centro) Fase della cattura con alta efficienza dell’antigene.

L’obbiettivo consiste nel caratterizzare la risposta del sensore realizzato nei vari regimi di utilizzo e operante nei diversi protocolli di funzionalizzazione messi a punto.

## RISULTATI OTTENUTI

Uno schema del sensore realizzato è mostrato in Figura 6. Con riferimento alla Figura 6 si ha una prima fase (1) di irraggiamento degli anticorpi anti-B(a)P con impulsi laser UV. In (2) si mostra l’apparato fluidico per la circolazione di una soluzione contenente antigeni (anche in acqua marina). In (3) è mostrato in vero e proprio sensore per la rivelazione del B(a)P con la sua unità di controllo. Il segnale viene acquisito in tempo reale da un computer portatile (4).



**Figura 6.** Schema del sensore realizzato

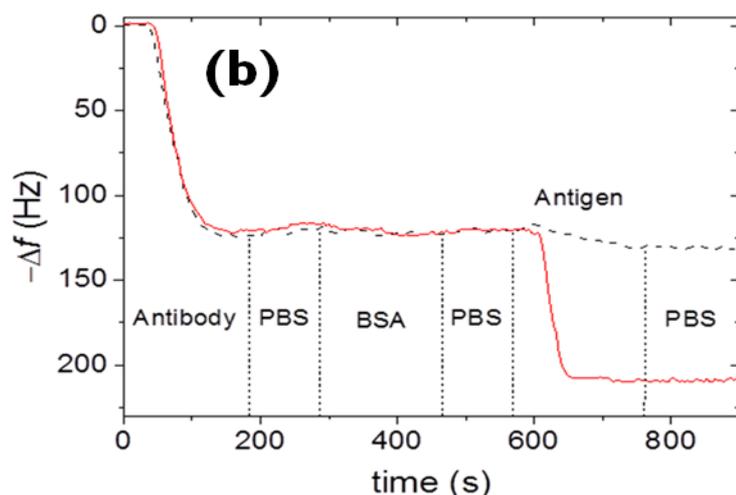
Le misure effettuate hanno dimostrato la capacità del sensore innovativo realizzato nel rivelare il BaP emesso in campioni reali. I campioni utilizzati sono stati realizzati sia in fase liquida in soluzioni acquose a diversa salinità che precludono a test in acqua marina, sia sono prelievi di gas emessi da un motore 1.0 di una FIAT Panda (euro 5) del CNR. In quest’ultimo caso sono state effettuate misure per diversi regimi motori. Il sensore è in grado di rivelare il B(a)P in concentrazioni superiori a circa 25-30 ppb emesso dal motore al minimo regime per un tempo di prelievo di 0.5 h, o dal motore nel ciclo urbano. La misura effettuata dal sensore è stata paragonata con quella ottenuta su campioni identici ottenuta con un apparato di Gas-Cromatografia Spettrometria di Massa (GC-MS) per validare il dato ottenuto con il nuovo dispositivo contro il risultato ottenuto con una tecnologia consolidata e di alta affidabilità e sensibilità,



ma basata su apparati complessi, off-line, costosi e di complessa operabilità. L'accordo tra i due metodi di misura è eccellente in tutte le condizioni provate.

In Figura 7 si rappresenta una tipica misura di B(a)P in soluzione acquosa con buffer PBS in condizioni fisiologiche. Si può notare l'estrema efficacia della tecnologia di immobilizzazione di anticorpi per irraggiamento con laser UV, messa a punto dal soggetto attuatore e denominata PIT (Photonic Immobilization Technique, vedere lista delle pubblicazioni nei PRODOTTI REALIZZATI).

Si mette in evidenza come grazie alla tecnologia PIT la sensibilità del sensore portatile realizzato cresca anche di un fattore circa 100 rispetto al caso in cui la PIT non venga applicata. L'incertezza associata alla misura condotta col sensore innovativo realizzato è molto contenuta (<10%), essendo anche inferiore a quella tipica di un apparato di alta risoluzione come il GC-MS. Si è, pertanto, realizzata una nuova tecnologia di grande accuratezza e risoluzione associata ad un nuovo dispositivo portatile e dai costi contenuti.



**Figura 7.** Tipica misura di B(a)P in soluzione salina (PBS condizioni fisiologiche) col sensore realizzato. La risposta del dispositivo con protocollo PIT (curva rossa) è paragonata a quella senza il passaggio per il protocollo PIT (curva nera). Clamorosa la differenza che dimostra come la PIT sia essenziale per un'efficace rivelazione del B(a)P. I due salti in frequenza,  $\Delta f$ , corrispondono all'appesantimento della QCM. Il primo, prima di 200 s, rappresenta la fase di funzionalizzazione con ancoraggio di anticorpi anti-B(a)P, la seconda a circa 600 s corrisponde alla cattura dell'antigene, B(a)P presente in soluzione. Le fasi intermedie (PBS-BSA-PBS) piatte assicurano che l'iniziale funzionalizzazione con anticorpi sia stabile sulla lamina d'oro.

## PRODOTTI REALIZZATI

### Pubblicazioni

1. B. Della Ventura, C. Altucci et al., "Light assisted antibody immobilization for bio-sensing", *Biomed. Opt. Expr.* **2**, 3223-3231 (2011);
2. R. Funari, C. Altucci et al., "UV-light-assisted functionalization for sensing of light molecules", *Optical Sensors* **8774**, UNSP 87740K (2013);
3. R. Funari, C. Altucci et al., "Detection of Parathion Pesticide by Quartz Crystal Microbalance



Functionalized with UV-Activated Antibodies”, *Anal. Chem.* **85**, 6392-6397 (2013);

4. S. Lettieri, C. Altucci et al., “Nano- and femtosecond UV laser pulses to immobilize biomolecules onto surfaces with preferential orientation”, *Appl. Phys. A Materials Science & Processing* **117**, 185-190 (2014);
5. R. Funari, C. Altucci et al., “Detection of parathion and patulin by quartz-crystal microbalance functionalized by the photonics immobilization technique”, *Biosensors & Bioelectronics* **67**, 224-229 (2015);

### **Brevetto Italiano**

C. Altucci et al., “Dispositivo portatile e metodo per la rivelazione e la misura di antigeni specifici”, brevetto depositato presso Ufficio Italiano Brevetti (2015, n. domanda 102016000001660).

### **Obiettivo 3**

Attività svolte dalla Stazione Zoologica Anton Dohrn (SZN)

#### **INTRODUZIONE**

Come è noto, il mercurio presente nell’ambiente marino, in particolare la sua forma organica dimetilmercurio, entra nella catena alimentare attraverso il plancton, gli invertebrati, i pesci e raggiunge i grandi consumatori, tra cui l’uomo, provocando danni al sistema nervoso. La componente dominante del plancton animale è rappresentata dai copepodi, crostacei erbivori che si nutrono di microalghe e rappresentano la dieta principale dei pesci. Essi costituiscono, pertanto, un ‘link’ diretto tra il fitoplancton e i consumatori superiori, fino all’uomo e rivestono un ruolo chiave nella catena trofica influenzando in ultimo anche la resa della pesca. I ricci di mare sono i principali consumatori di alghe e piante marine nelle acque poco profonde e rivestono quindi un ruolo molto importante nella la salvaguardia del bio-sistema acquatico e per il mantenimento dell’equilibrio delle reti trofiche marine dei primi metri di profondità attraverso la regolazione della crescita delle alghe sui substrati rocciosi. La loro salvaguardia e conservazione è quindi estremamente rilevante e studiare l’effetto di inquinanti su adulti e stadi larvali può fornire utili strumenti per la comprensione degli effetti di inquinanti tossici ed eventualmente individuare azioni di rimedio. I ricci di mare sono stati a lungo utilizzati per studi di ecotossicologia grazie alla facile reperibilità degli animali in tutto il mondo, all’elevata sensibilità dei processi di fecondazione e di sviluppo alle condizioni ambientali, la possibilità di osservare direttamente la fecondazione e lo sviluppo, costi contenuti per la realizzazione del test, all’alta significatività statistica dei test, perché si usano milioni di uova e di sperma.

#### **OBBIETTIVO**

L’obiettivo generale è consistito nel valutare gli effetti di mercurio e altri metalli pesanti su organismi marini che rivestono un ruolo ecologico di grande rilevanza per nella colonna d’acqua (copepodi) e sui fondali, a diretto contatto dei sedimenti (riccio di mare). In considerazione del fondamentale ruolo dei copepodi e dei ricci nell’ambiente marino, abbiamo, condotto uno con l’obiettivo di ampliare il numero



di 'stress genes' da impiegare come biomarker negli studi ecotossicologici.

## METODO

Abbiamo utilizzato differenti tecniche di microscopia a fluorescenza per analizzare l'induzione della morte cellulare per apoptosi nelle larve della specie di copepode *Acartia tonsa* esposte a concentrazioni subletali di nickel. Allo scopo di individuare 'stress genes' da impiegare come biomarker in studi tossicologici abbiamo utilizzato un approccio trascrittomico nel copepode *Calanus helgolandicus*, una specie dominante negli ecosistemi produttivi del Mar Mediterraneo. Grazie allo studio delle sequenze ottenute, è stato possibile selezionare geni coinvolti nella risposta allo stress, nello sviluppo, nella riproduzione e nell'omeostasi cellulare. La variazione dell'espressione di questi geni in copepodi, come nei ricci di mare, raccolti dall'ambiente marino potrà essere utilizzata, in ultimo, in test "tossicogenomici" come bioindicatori per la valutazione del rischio ambientale legato alla presenza di inquinanti, tra cui il mercurio.

Durante il corso del progetto sono stati valutati gli effetti di concentrazioni crescenti di  $Hg^{2+}$ , sotto forma di  $HgCl_2$ , sullo sviluppo larvale di due diverse specie di ricci di mare: *Echinometra mathaei*, il riccio più diffuso e abbondante in regioni tropicali e subtropicali, e *Paracentrotus lividus*, la specie più diffusa in Mediterraneo, largamente utilizzato per l'alimentazione umana. Mediante tecniche di microscopia innovative come "Harmonic Generation Microscopy" (HGM) e microscopia a due fotoni (TP) sono stati verificati segnali di fluorescenza potenzialmente associabili a stress chimico dovuto all'esposizione al mercurio. HGM e TP sono tecniche meno invasive della scansione laser, permettendo la visualizzazione di segnali endogeni e autofluorescenti del campione in toto, con risoluzione spaziale a livello di micron e senza l'uso di sonde fluorescenti. Inoltre, abbiamo usato il probe fluorescente TUNEL per rilevare cellule apoptotiche (in fase di morte) in larve di riccio esposte ad  $HgCl_2$ , lo ioduro di propidio per visualizzare in vivo cellule necrotiche, ed Hoechst 33342 per rilevare i nuclei cellulari.

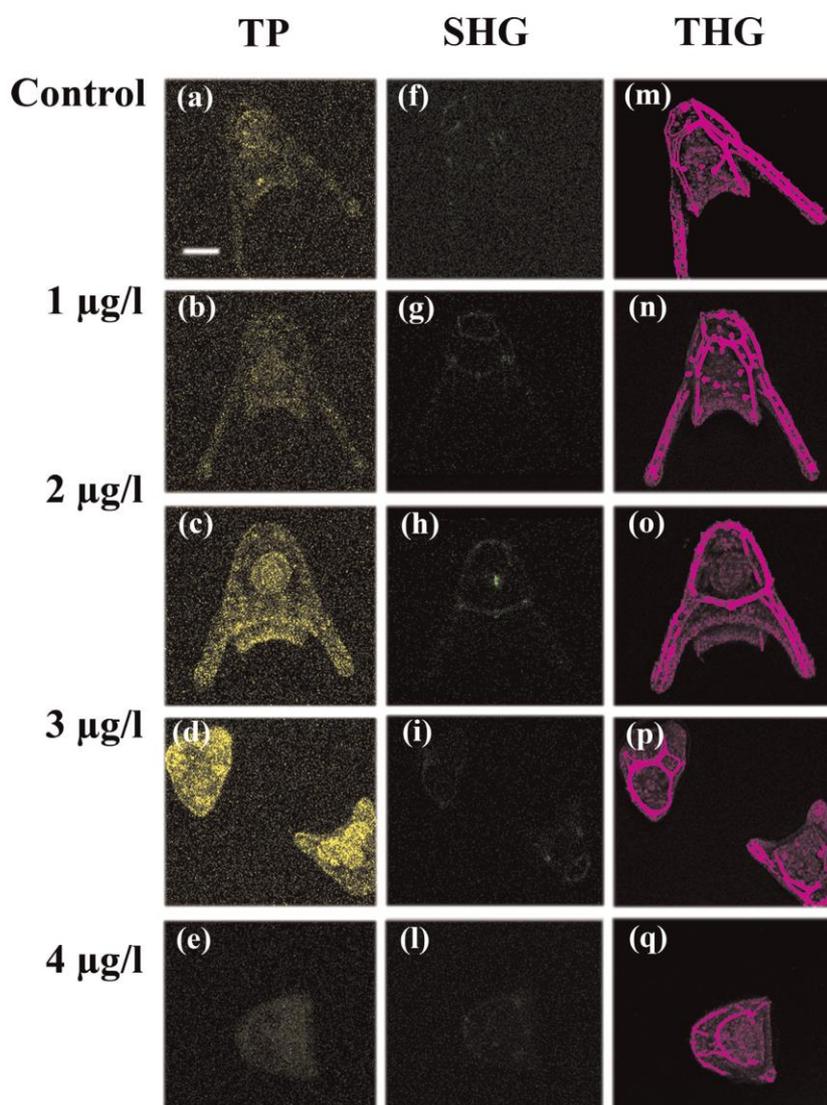
Durante il periodo di svolgimento del progetto abbiamo inoltre studiato il meccanismo molecolare coinvolto nella risposta allo stress indotto da due inquinanti, cadmio e manganese, nel *P. lividus* per individuare possibili marcatori molecolari attivati in risposta alla presenza di inquinanti, incluso metalli pesanti. Abbiamo seguito l'espressione quantitativa di un set di 19 geni coinvolti nei processi di risposta allo stress, scheletogenesi e detossificazione a diversi stadi di sviluppo utilizzando tecniche quali real time-qPCR. Abbiamo inoltre valutato gli effetti a breve termine di cadmio e manganese a concentrazioni ecologicamente rilevanti ( $10^{-6}$  e  $3,6 \times 10^{-5}$  M, rispettivamente) su femmine adulte della stessa specie di riccio e sulla loro progenie, allevando le larve in assenza o presenza dei suddetti metalli pesanti e valutando i risultati da un punto di vista morfologico, attraverso l'osservazione microscopica, sia attraverso lo studio della variazione di espressione genica tramite tecniche di real time-qPCR.

## RISULTATI OTTENUTI

I risultati ottenuti hanno mostrato un aumento del numero di larve di ricci malformati in correlazione con concentrazioni crescenti di mercurio (fino a  $20 \mu g L^{-1}$ ) (Buttino et al 2015). Tuttavia, le due specie di riccio studiate, la specie tropicale e subtropicale *Echinometra mathaei*, e la specie più diffusa in Mediterraneo *Paracentrotus lividus*, hanno mostrato sensibilità diversa e in particolare la specie



subtropicale è risultata maggiormente sensibile con un valore di  $EC_{50}$  (concentrazioni di contaminante in grado di indurre malformazioni nel 50% dello stadio larvale di pluteo a 4 braccia) 8 volte inferiore ( $2.41 \mu\text{g L}^{-1}$ ) rispetto alla specie presente in Mediterraneo ( $16.14 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La microscopia “Harmonic Generation Microscopy” è stata in grado di evidenziare spicole scheletriche malformi in larve trattate con il mercurio (Fig. 8). Dalle osservazioni al microscopio laser confocale a fluorescenza (Zeiss, LSM 510 META) si evince che il mercurio agisce principalmente compromettendo la permeabilità della membrana cellulare nella specie Mediterranea, mentre induce apoptosi nella specie tropicale. I nostri risultati mostrano che alte concentrazioni di mercurio, nella forma  $\text{HgCl}_2$ , sono in grado di indurre malformazioni in entrambe le specie di riccio studiate, compromettendone la sopravvivenza e in ultimo il reclutamento delle larve ad adulto con possibili gravi conseguenze sulla pesca.



**Figura 8.** Plutei del riccio tropicale *Echinometra mathaei* esposti a differenti concentrazioni di  $\text{HgCl}_2$  (linea orizzontale) osservate mediante diverse tecniche (colonne). (a-e) microscopia a due fotoni (TP); (f-l) microscopia di generazioni di seconda armonica (SHG); (m-q) microscopia di generazioni di terza armonica (THG). (Bar $^1/464.3$  mm). Sono evidenti i ritardi nello sviluppo a concentrazioni di  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  e la presenza di malformazioni a 3 e  $4 \mu\text{g L}^{-1}$ .



In generale, gli ioni metallici presenti come inquinanti, quali il cadmio e il manganese, possono indurre ritardo dello sviluppo e anomalie nel riccio di mare *P. lividus*. I risultati che abbiamo ottenuto dagli studi sugli effetti di questi due metalli a livello molecolare, ci hanno permesso di individuare diverse classi di geni che vengono attivati ed espressi sia direttamente sia attraverso la mediazione del secondo messaggero ossido nitrico (NO) aprendo nuove prospettive riguardo il ruolo del NO come sensore di diversi agenti di stress negli embrioni in via di sviluppo del riccio di mare (Migliaccio et al 2014). Questi metalli hanno un effetto non solo sulle larve, ma anche su femmine adulte e sulla loro progenie. In particolare, sono stati esaminati: la morfologia degli embrioni derivanti da femmine esposte agli inquinanti per valutare la presenza di anomalie (Migliaccio et al 2015). Inoltre è stata valutata la variazione dell'espressione genica della progenie rispetto ad un controllo non trattato. Questi studi hanno dimostrato che entrambi i metalli compromettono i processi di fecondazione delle femmine trattate, causando modifiche nello stato riproduttivo e influenzando la produzione del messaggero NO nelle ovaie. Un'analisi dettagliata della progenie ha mostrato un'elevata percentuale di embrioni anomali, associata ad una variazioni nell'espressione di diversi geni coinvolti nella risposta allo stress, scheletogenesi, detossificazione e nella produzione di NO. Nel complesso, i risultati di questa sperimentazione contribuiscono ad ampliare le conoscenze sugli eventi molecolari coinvolti negli effetti tossici dei metalli pesanti sulla progenie del riccio *P. lividus* esposti a tali inquinanti con possibili conseguenze negative sulla sopravvivenza di questa specie.

In considerazione del possibile bioaccumulo e biotrasformazione del mercurio e di altri inquinanti nei copepodi, con possibili ricadute sui consumatori superiori quali pesci e mammiferi, risulta importante investigare le risposte fisiologiche, biochimiche e molecolari di questi organismi planctonici esposti a inquinanti. In un primo studio, abbiamo applicato tecniche di microscopia a fluorescenza per analizzare l'induzione di apoptosi nei naupli del copepode *Acartia tonsa* esposti a basse concentrazioni di cloruro di nichel ( $\text{NiCl}_2$ ). I naupli appena schiusi e in fasi naupliari successive, sono stati esposti a concentrazioni crescenti di  $\text{NiCl}_2$  (0,016, 0,025 e 0,063  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) per 7 giorni e poi colorate con annessina V-FITC, una sonda fluorescente vitale comunemente utilizzata per visualizzare le cellule apoptotiche nei campioni in vivo (Buttino et al. 2011). I nauplii sono stati colorati anche con TUNEL, una sonda fluorescente utilizzata per rilevare l'apoptosi in copepodi fissati. Inoltre, abbiamo usato per la prima volta in questo tipo di studi, la microscopia a fluorescenza a due fotoni (2PF) nonché la microscopia che utilizza seconda e terza generazione armonica (SHG e THG) per studiare l'apoptosi nei naupli di *A. tonsa* senza l'uso di sonde fluorescenti. I segnali ottenuti con 2PF e THG risultavano aumentati in campioni esposti a concentrazioni elevate di Ni, rispetto al controllo, mentre segnali SHG erano simili in tutti i campioni.

Negli ultimi anni, è stata dedicata molta attenzione ad ampliare il numero di 'stress genes' da impiegare come biomarker negli studi ecotossicologici, ma anche ad estendere tali test molecolari in organismi che abbiamo un'elevata valenza ecologica come i copepodi (Lauritano et al. 2012 review). Pertanto, in una prima fase sperimentale, abbiamo messo a punto i protocolli sperimentali per l'estrazione dell'RNA totale dal copepode *Calanus helgolandicus* e per la successiva retro-trascrizione in DNA. Sono stati successivamente selezionati i geni di controllo 'reference' e quelli di interesse 'target', la cui espressione quantitativa è stata valutata in laboratorio in individui esposti a varie condizioni sperimentali. I geni 'target' sono stati selezionati sulla base del loro ruolo nella risposta



allo stress, nella fisiologia riproduttiva, nello sviluppo e nell'omeostasi cellulare dei copepodi. In una seconda fase sperimentale, sono state disegnate sonde geniche specifiche (primer) per amplificare selettivamente i geni 'reference' e 'target', utilizzando programmi bioinformatici e database pubblici (Blast, Clustal W, GenBank). I copepodi impiegati nella sperimentazione sono stati raccolti da un sistema di allevamento a circuito chiuso presente presso la SZN o dall'ambiente naturale (Mar Adriatico e Golfo di Napoli). I geni di controllo 'reference' selezionati al termine della sperimentazione sono: elongation factor 1 $\alpha$  (EFA), adenosina-3-fosfato sintasi (ATPs), istone 3 (HIST), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), unità ribosomiali (18S, S7, e S20), ubiquitina (UBI),  $\beta$ -actina (ACT),  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina.

I geni selezionati come 'target' in seguito alla sperimentazione con sostanze tossiche sono: citocromo P450-4 (CYP4), aldeide deidrogenasi 2, 3, 6, 7, 8, 9 (ALDH 2-9), glutatione-S-transferasi (GST), glutatione sintasi (GSH-S), catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD), proteina suscettibile all'apoptosi cellulare (CAS), proteina regolatrice del ciclo cellulare e dell'apoptosi (CARP), proteina inibitrice dell'apoptosi (IAP), heat shock protein 40 e 70 (HSP 40 e HSP70), glicoproteina 93 (GR93), e la chaperonina molecolare membro del complesso T-complex protein 1 (TCP-1).

Nel complesso, questi geni sono coinvolti nella risposta generica allo stress, nella modificazione ossidativa e biotrasformazione di agenti chimici, nel ciclo cellulare e infine, nella formazione di complessi idrosolubili con le sostanze tossiche, facilitandone la loro escrezione cellulare. Di particolare interesse è la catalasi, coinvolta nell'ossidazione del mercurio atomico a mercurio divalente (Clarkson, 1994) che ne facilita l'escrezione, mentre è noto che la superossido dismutasi riduce il mercurio divalente nel fegato, in modo da consentirne l'eliminazione attraverso il sistema sanguigno (Khera, 1979).

### Prodotti realizzati

1. Buttino I, Pellegrini D, Romano G, Hwang J-S, Liu T-M, Sartori D, Sun C-K, Macchia S, Adrianna Ianora, 2012. Study of apoptosis induction using fluorescent and higher harmonic generation microscopy techniques in *Acartia tonsa* nauplii exposed to chronic concentrations of nickel. *Chemistry and Ecology*, 27:sup2, 97-104
2. Buttino I, Hwang J-S, Romano G, Sun C-K, Liu T.-M. et al., 2015. Detection of malformations in sea urchin plutei exposed to mercuric chloride using different fluorescent techniques. *Ecotoxicology and environmental safety*. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.07.027
3. Carotenuto, Y., Esposito, F., Pisano, F., Lauritano, C., Perna, M., Miralto, A., Ianora, A., 2012. Multi-generation cultivation of the copepod *Calanus helgolandicus* in a re-circulating system. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 418-419, 46-58.
4. Carotenuto, Y., Dattolo, E., Lauritano, C., Pisano, F., Sanges, R., Miralto, A., Procaccini, G., 2014. Insights into the transcriptome of the marine copepod *Calanus helgolandicus* feeding on the oxylipin-producing diatom *Skeletonema marinoi*. *Harmful Algae* 31, 153-162.
5. Lauritano, C., Borra, M., Carotenuto, Y., Biffali, E., Miralto, A., Procaccini, G. & Ianora, A., 2011. First molecular evidence of diatom effects in the copepod *Calanus helgolandicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 404, 79-86.



6. Lauritano, C., Borra, M., Carotenuto, Y., Biffali, E., Miralto, A., Procaccini, G., Ianora, A., 2011. Molecular evidence of the toxic effects of diatom diets on gene expression patterns in copepods. *Plos One* 6(10), e26850.
7. Lauritano, C., Carotenuto, Y., Miralto, A., Procaccini, G., Ianora, A., 2012. Copepod population-specific response to a toxic diatom diet. *Plos One* e47262.
8. Lauritano, C., Carotenuto, Y., Procaccini, G., Turner, J.T., Ianora, A., 2013. Changes in expression of stress genes in copepods feeding upon a non-brevetoxin producing strain of the dinoflagellate *Karenia brevis*. *Harmful Algae*, 28: 23-30.
9. Migliaccio O, Castellano I, Romano G, Palumbo A, 2014 Stress Response to Cadmium and Manganese in *Paracentrotus lividus* developing embryos is mediated by Nitric Oxide. *Aquatic Toxicology*, 156:125-134
10. Migliaccio O, Castellano I, Cirino P, Romano G, Palumbo A, 2015. Maternal exposure to cadmium and manganese impairs reproduction and progeny fitness in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *PLoS ONE* 10(6): e0131815. doi:10.1371/journal.pone.0131815

#### Obiettivo 4

Attività svolte dal Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale (SUN-DBBPG) della Seconda Università degli studi di Napoli.

#### INTRODUZIONE

Molte reazioni biologiche sono determinate a seguito di trattamenti con estratti di frutti e piante, cresciute a ridosso di bacini idrici contaminati. Alcune piante e frutti, o parte di essi, possono essere impiegati per usi terapeutici, spesso sfruttando i principi attivi in essi contenuti. Per questo motivo, dai prodotti naturali possono derivare droghe differenti, caratterizzate da principi attivi qualitativi e quantitativi in grado di sviluppare diverse proprietà terapeutiche. Alcune sostanze estratte da un determinato frutto o da una determinata pianta, possono presentare più di un principio attivo con attività farmacologica in grado di fungere da eccipienti naturali modulando la farmacocinetica del prodotto stesso. Le caratteristiche delle piante o dei frutti utilizzati a scopo terapeutico, nonché la variabilità nel contenuto dei principi attivi, sono alterate anche in base ai fattori ecologici, quali il clima, la costituzione del terreno e i fattori biotici. Negli ultimi anni le sostanze naturali rappresentano dei mediatori ecologici e un potenziale serbatoio di sostanze terapeutiche innovative per la salute umana. Queste molecole sono caratterizzate da un'elevata varietà strutturale e possono essere considerate come punti di partenza per sviluppare librerie di composti selezionate e validate biologicamente.

#### OBIETTIVO

L'obiettivo del soggetto attuatore Seconda Università degli studi di Napoli (Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale), è consistito nell'estrapolazione e nella caratterizzazione dei principi attivi contenuti nei prodotti naturali analizzati e nello *screening* di interazione nei confronti di numerosi *targets* biologici. Tale obiettivo è finalizzato a studi terapeutici e preventivi legati a gravi patologie quali il cancro, mediante applicazioni mirate su molecole biologiche naturali. Gli scopi dell'obiettivo sono stati realizzati attraverso la collaborazione combinata con altri componenti attuatori del progetto, ossia la Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli (SZN) e IBB.



L'unità DBBPG è stata maggiormente coinvolta nell'obiettivo 4. Inoltre, relativamente all'obiettivo, sono stati effettuati degli studi riguardanti le attività benefiche di piante e frutti o di spugne marine e micro-alghe.

## METODO

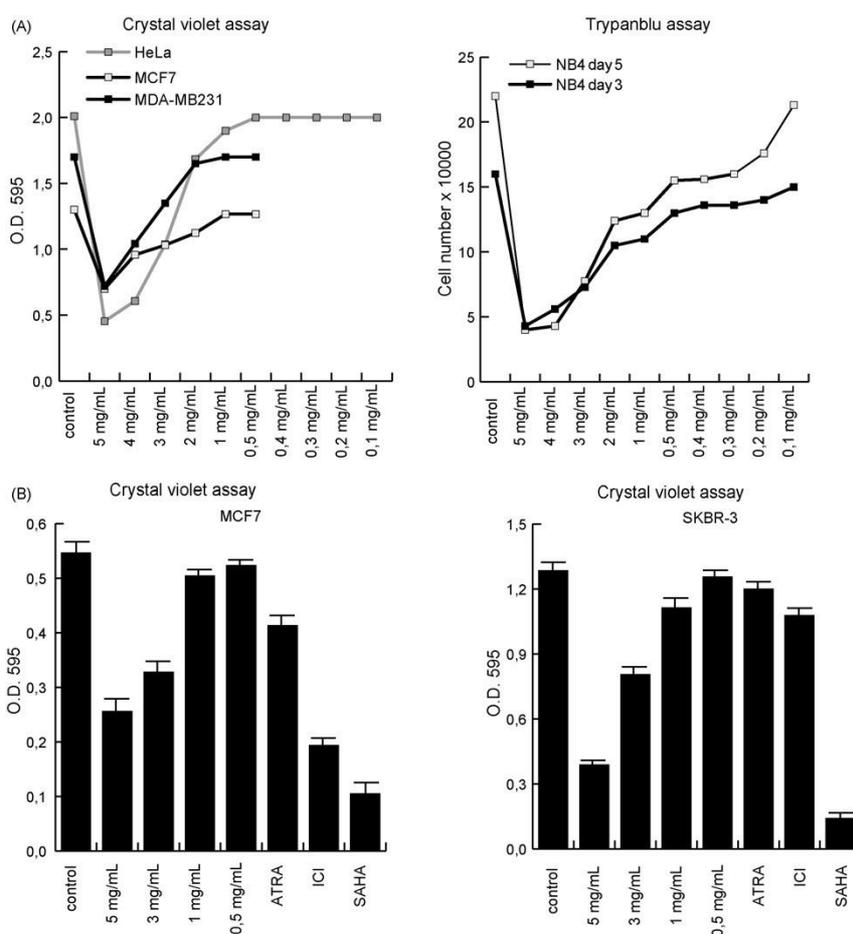
Il metodo è consistito nell'estrazione selettiva di componenti bioattivi contenuti all'interno di piante e frutti, ma anche di microalghe. Le diverse frazioni contenute nei prodotti naturali analizzati, sono state esaminate e sottoposte a metodi di estrazione acetoneica, metanolica e purificazione di componenti bioattivi. Inoltre sono stati valutati e caratterizzati, attraverso saggi qualitativi e quantitativi, biochimici ed enzimatici, gli effetti antiproliferativi, antimicrobici e antiossidanti su linee cellulari tumorali umane. In particolare le attività antiossidanti sono state valutate attraverso due metodi:  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) e Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). Contestualmente sono state effettuate analisi di ciclo cellulare, di detezione apoptotica e differenziamento attraverso l'utilizzo di un citofluorimetro a flusso. Inoltre sono state effettuate estrazioni di proteine totali (o delle frazioni) ed estrazioni del DNA e dell'RNA delle linee analizzate al fine di individuare specifici *targets* biologici con impatto di natura epigenetica attraverso tecniche di real-time PCR e PCR semiquantitativa. La morfologia delle cellule trattate, è stata valutata attraverso metodi colorimetrici come il May-Grünwald Giemsa, che, per esempio, permette di differenziare i globuli bianchi in linee tumorali ematologiche. Altre indagini hanno riguardato il livello di proliferazione delle cellule tumorali a seguito del trattamento con composti naturali selezionati. Le attività anticancro dei composti analizzati, sono state anche valutate attraverso esperimenti *in vivo* (modelli *xenograft*) ed *ex vivo* (blasti primari).

## RISULTATI OTTENUTI

Per piante e frutti abbiamo studiato Feijoa Sellowiana, originaria dell'America Meridionale, ma viene coltivato anche nell'Italia Meridionale (1). Feijoa presenta tantissime attività benefiche, come l'elevato contenuto di vitamina C, beta carotene, vitamina B6, sali minerali e flavonoidi, che hanno un ruolo importantissimo nel miglioramento dell'apparato circolatorio. La polpa di Feijoa, presenta attività anticancerogene grazie alla quercetina e al canferolo contenuti in essa. In particolare l'estratto acetoneico di Feijoa presenta attività antineoplastiche sia in tumori solidi che ematologici. Gli effetti di questo frutto sono mirati prevalentemente verso le cellule tumorali e non ci sono effetti tossici in cellule normali, suggerendo un'attività tumore-selettiva. A seguito di una purificazione dell'estratto acetoneico di Feijoa, il flavone è stato identificato come componente attivo. Infatti il flavone è in grado di indurre apoptosi, accompagnata dall'attivazione delle caspasi in cellule umane provenienti da leucemia mieloide acuta. Tali studi sono stati effettuati su campioni di pazienti affetti da leucemia mieloide acuta confermando che l'estratto acetoneico derivante da Feijoa e il suo derivato, il flavone, sono capaci di indurre la morte delle cellule cancerose. In Figura 9 è mostrato l'effetto antiproliferativo dell'estratto acetoneico di Feijoa in diverse linee tumorali umane, quali il cancro alla mammella (MCF7, MDA-MB 231, SKBR3) e alla cervice uterina (Hela). Tale effetto è stato valutato mediante un saggio quantitativo che utilizza un colorante cellulare chiamato cristal violet. La linea ematologica di leucemia promielocitica (NB4), invece è stata analizzata con attraverso un metodo di colorazione vitale che



utilizza il tripan blu.

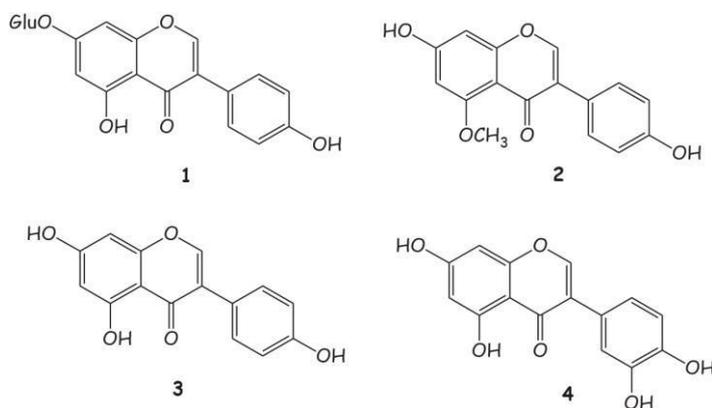


**Figura 9.** In A a sinistra e in B sono mostrate le curve di proliferazione attraverso un saggio che utilizza la *crystal violet* su diverse linee cellulari. In A a destra, invece, è mostrata la curva di proliferazione relativa alla linea NB4.

Inoltre sono stati valutati anche i livelli di espressione di fondamentali effettori molecolari, tra cui p16, p21 e TRAIL, che sono coinvolti nella regolazione dell'apoptosi tumore-selettiva. I nostri studi hanno coinvolto anche l'utilizzo di piante medicinali come *Genista sessilifolia* DC (2). *Genista* è un genere di pianta appartenente alla famiglia delle leguminose e consiste di 87 specie distribuite in



maniera predominante nell'area Mediterranea. Questa pianta presenta delle foglie sessili o sub-sessili e fiori gialli. In Italia, queste specie si diffondono nei boschi che si trovano a 800 metri al di sopra del livello del mare. La composizione di queste piante è caratterizzata dalla presenza di flavoni, alcaloidi chinolizidinici, glicoflavoni e soprattutto di isoflavoni. **In Figura 10** sono mostrati i componenti attivi delle frazioni estrapolate da *Genista*.

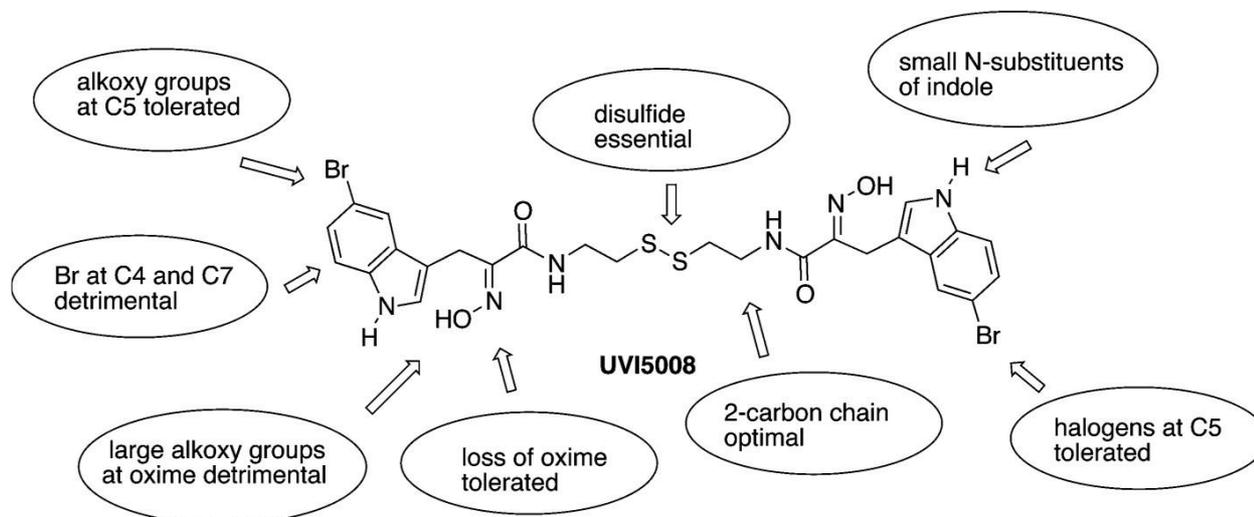


**Figura 10.** Componenti attivi della frazioni di *Genista*: (1) Genistina; (2) Isoprunetina; (3) Genisteina; (4) Orobol

Diverse specie di *Genista* presentano delle attività biologiche interessanti quali funzioni ipoglicemiche, anti infiammatorie, antiossidanti e citotossiche. Tali proprietà sono state esaminate in numerose linee cellulari tumorali umane. Inoltre sono stati valutati gli effetti degli estratti metanolici dalle parti aeree di *G. sessilifolia* e *G. tinctoria*. Le parti aeree sono state raccolte durante uno stadio di piena fioritura da piante cresciute nel parco nazionale del Cilento (Salerno). Le attività antitumorali di *Genista* sono state valutate su cellule di leucemia promielocitica umana NB4. Gli estratti totali di questa pianta hanno mostrato avere effetti antiproliferativi già dopo 24 ore dal trattamento. Inoltre sono stati analizzati gli effetti sul ciclo cellulare e il differenziamento di questi tumori ematologici a seguito del trattamento con l'estratto totale di questa pianta. Gli esperimenti sono stati anche condotti sulla linea di leucemia mieloide acuta umana U937, su cellule di cancro alla mammella come le MDA-MB231 e MCF7, ma anche su cellule di cancro alla cervice (Hela) e cancro alla prostata (LNCAP). La morte cellulare è stata valutata attraverso l'attivazione delle caspasi accompagnate dall'espressione di p21, Rb, p53, Bad e TRAIL, importanti *markers* noti. Sono state inoltre valutate le caratteristiche delle frazioni della pianta che risultassero essere biologicamente più attive e ne sono state selezionate alcune per una valutazione più dettagliata delle proprietà curative di *Genista*. Lo studio dell'attività antitumorale da parte di prodotti di origine naturale, si è focalizzato



anche sulla psammaplina A, isolata per la prima volta nel 1987 da una spugna marina. La psammaplina A è un dimero di disolfuro simmetrico derivato dalla condensazione di unità modificate di tirosina e cisteina (3) e presenta attività antitumorali ed antibatteriche. Il meccanismo d'azione della psammaplina A determina una citotossicità significativa e specifica verso cellule umane di cancro al polmone, ovario, pelle e colon. La psammaplina A è in grado di inibire enzimi epigenetici quali le istone deacetilasi (*HDACs*) e le DNA metiltrasferasi (*DNMTs*), che costituiscono dei *targets* fondamentali per il trattamento e la prevenzione del cancro ed altre patologie. Le modifiche che avvengono nella cromatina rappresentano un altro potenziale meccanismo legato alle attività anticancro svolte dalla psammaplina A. La capacità di avere come bersaglio più di un membro coinvolto nel macchinario epigenetico, ha portato alla sintesi di analoghi di psammapline (4), in modo tale da poter studiare e determinare gli elementi strutturali per il loro profilo epigenetico. Gli effetti della psammaplina A sono stati anche analizzati sulla linea di leucemia mieloide acuta umana U937. In questo modello cellulare sono stati valutati i livelli di apoptosi, ciclo e differenziamento cellulari e l'espressione di importanti *markers* epigenetici quali p21WAF1 e l'acetilazione della tubulina e dell'istone H3. L'idea di produrre derivati sintetici della psammaplina A ha consentito la possibilità di sviluppare composti capaci di esibire potenzialità antitumorali/antisetliche comparabili o addirittura più efficaci rispetto al prodotto naturale. Tra questi, il composto UVI5008, ha una tripla attività inibitoria concernente gli *HDACs*, le *DNMTs* e le sirtuine (5). UVI 5008 è in grado di indurre una significativa metilazione dei promotori RAR $\beta$  e p16 ed è in grado di indurre una selettiva morte di cellule cancerose esercitando le sue attività in diversi modelli tumorali di topo e di cancro alla mammella umani. Le sue capacità antitumorali coinvolgono l'attivazione indipendente di recettori di morte e di specie reattive dell'ossigeno. L'azione di questa molecola è stata valutata su diverse linee di cellule tumorali come le U937, Ku-812F, K562 (derivanti dalla leucemia), le MCF7 (derivanti dal cancro alla mammella), U2OS (derivanti dall'osteosarcoma), DU145 (derivanti dalla prostata) e HCT116 (derivanti dal colon). E' stato valutato inoltre, che UVI5008 induce un aumento dei livelli di espressione della proteina p16 nella linea leucemica U937 e saggi *in vitro*, hanno mostrato che questa molecola agisce come diretto inibitore di DNMT3a ed è in grado di bloccare l'attività di HDAC1-4, noti *markers* epigenetici. Se trattato nelle U937, UVI5008 è in grado di indurre l'espressione del noto target p21 e l'iperacetilazione dell'istone H3 in blasti leucemici *ex vivo*. Analisi di immunistoichimica hanno dimostrato una forte espressione dei livelli di acetilazione dell'istone H3 sulla lisina 9 in topi HCT116 *xenografts* trattati con UVI5008. In **Figura 11** è illustrata una rappresentazione schematica dello studio tra la struttura chimica e/o 3D di questi composti e la loro attività biologica: studio SAR (*Structure-Activity Relationship*).



**Figura 11.** Rappresentazione schematica dello studio SAR

Altre indagini sono state anche condotte su *Solanum tuberosum L. var. Vitelotte*, che è una varietà di patata ampiamente usata per l'alimentazione e che viene coltivata in Francia sin dal diciannovesimo secolo (6). Questa patata ha un particolare colore viola, determinato da un'elevata presenza di antocianine. Lo studio condotto è stato mirato alla caratterizzazione e alla misurazione della concentrazione di antocianine nelle patate pigmentate per valutare le attività antiossidanti e antimicrobiche e gli effetti antiproliferativi in linee cellulari di cancro sia solido che ematologico. Nella **tabella 2** sono illustrati i valori di concentrazione minima inibitoria (MIC) e di concentrazione minima battericida (MIB) provenienti da estratti antocianinici di *Solanum tuberosum*.

	MIC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )				MBC Anthocyanins
	Anthocyanins	CTAX	PENG	TET	
<i>S. aureus</i> ATCC 13709	15.6	2	0.03	2	62.5
<i>S. aureus</i> CI	31.3	R	R	R	125
<i>E. faecalis</i> ATCC 14428	15.6	R	8	2	R
<i>E. faecalis</i> CI	31.3	R	R	R	R
<i>P. vulgaris</i> ATCC 12454	31.3	2	4	R	R
<i>P. vulgaris</i> CI	62.5	32	R	R	R
<i>P. mirabilis</i> ATCC 7002	31.3	0.03	4	32	R
<i>P. mirabilis</i> CI	62.5	32	R	R	R
<i>S. typhi</i> ATCC 19430	31.3	0.5	4	1	R
<i>S. typhi</i> CI	62.5	1	2	1	R
<i>E. cloacae</i> ATCC 10699	31.3	R	4	R	R
<i>E. cloacae</i> CI	62.5	R	R	R	R
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	31.3	R	4	R	R
<i>E. aerogenes</i> CI	62.5	R	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	62.5	16	R	32	R
<i>P. aeruginosa</i> CI	62.5	32	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	125	0.1	R	16	R
<i>K. pneumoniae</i> CI	250	32	R	R	R

**Tabella 21.** Valori di MIC e MIB da estratti antocianinici di *Solanum tuberosum*

In particolare, è stato analizzato un effetto antimicrobico molto forte nel batterio Gram-positivo *Staphylococcus aureus* e nel fungo *Rhizoctonia solani*. Inoltre, ci siamo anche occupati della valutazione in microalghe in forte collaborazione col soggetto capofila (SZN) e con IBB. Su circa 40 specie di microalghe abbiamo eseguito la preparazione di estratti e la valutazione di attività anti-proliferativa/citotossica in vitro su varie linee cellulari tumorali come la linea cellulare U-937 (in



sospensione) e su linee cellulari derivate da tumori solidi. Verifica contestuale di assenza di citotossicità su linee cellulari primarie/normali. Gli estratti che hanno mostrato un'attività medicinale interessante sono stati frazionati (IBP) ed il materiale è stato ritestato per consentire l'identificazione dei principi attivi.

## PRODOTTI REALIZZATI

### Pubblicazioni

1. Bontempo P, et al. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(10):1902-14. Epub 2007 May 25. PubMed PMID: 17604209.
2. Bontempo P, et al. *Genista sessilifolia* DC. extracts induce apoptosis across a range of cancer cell lines. *Cell Prolif.* 2013;46(2):183-92. doi: 10.1111/cpr.12022. PubMed PMID: 23510473
3. García J, et al. Epigenetic profiling of the antitumor natural product psammaphin A and its analogues. *Bioorg Med Chem.*19(12):3637-49. doi: 10.1016/j.bmc.2010.12.026. PubMed PMID: 21215647)
4. Pereira R, Benedetti R, et al. Indole-derived psammaphin A analogues as epigenetic modulators with multiple inhibitory activities. *J Med Chem.* 2012;55(22):9467-91. doi: 10.1021/jm300618u.. PubMed PMID: 23030799
5. Nebbioso A, et al. Death receptor pathway activation and increase of ROS production by the triple epigenetic inhibitor UVI5008. *Mol Cancer Ther.*10(12):2394-404. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0525. PubMed PMID: 21980132
6. Bontempo P, et al. Antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of *Solanum tuberosum* L. var. Vitelotte. *Food Chem Toxicol.* 2013 May;55:304-12. Doi: 10.1016/j.fct.2012.12.048. PubMed PMID: 23313609

### Obiettivo 5

Attività svolte dalla Stazione Zoologica Anton Dohrn (SZN)

### INTRODUZIONE

Relativamente pochi sono i dati disponibili attraverso la letteratura scientifica riguardanti i livelli di metalli pesanti rinvenibili in tessuti di molluschi cefalopodi. Nella maggior parte dei casi, gli studi hanno esaminato le ghiandole digestive di calamaro e polpo e determinato le concentrazioni di elementi metabolizzabili quali rame, ferro e zinco. In alcuni casi, sono stati anche determinate le concentrazioni di cadmio, alluminio, argento e mercurio. Sulla base delle statistiche della U.S. Food & Drug Administration (FDA) i livelli di mercurio presenti in tessuti di pesci e molluschi immessi alla vendita per il consumo umano (dati FDA 2005-2010) raggiungono per i calamari la concentrazione di 0.023 ppm. Tale valore è molto vicino a quello riscontrato nei tessuti del salmone.

Negli Stati Uniti d'America, la FDA considera fissato a 1.0 ppm il livello di attenzione per il metilmercurio in tessuti di pesci e molluschi. In Canada tale limite è fissato a 0.5 ppm.

Nel 2012 l'EFSA (l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) ha sottolineato come le carni di pesce e dei vari prodotti ittici risultano essere i primi "responsabili" della fonte di mercurio e



metilmercurio nella dieta umana. In particolare, l'EFSA stabilisce una raccomandazione che porta la dose massima settimanale tollerabile per il metilmercurio a 1.3 mg/kg di peso corporeo.

I cefalopodi – seppie, calamari e polpi – rappresentano una rilevante quota nel mercato di prodotti ittici in Mediterraneo, Europa e nel resto del Mondo. Queste specie di molluschi sono tutti animali marini, voraci predatori e come tali si posizionano ai vertici della catena alimentare; come tali essi rappresentano, pertanto, una importante possibile fonte di “contaminanti” nella nostra dieta. Diversi studi hanno dimostrato che i cefalopodi hanno la capacità di accumulare nei propri tessuti elementi in traccia ad elevati livelli (e.g.: 1-7). Da ciò deriva la maggiore attenzione per i rischi connessi al consumo di carne di cefalopodi sulla salute umana (8-10).

La grande maggioranza di specie di cefalopodi con interesse commerciale è nota per essere caratterizzate da abitudini migratorie, da acque più profonde a quelle costiere soprattutto nel corso della stagione riproduttiva quando gli animali depositano le uova in acque costiere che, come noto, sono maggiormente esposte a contaminanti costieri.

Le uova si sviluppano, quindi, in un ambiente che è esposto ad attività antropiche più intense, con maggiore esposizione a vari contaminanti quali metalli pesanti o metaboliti di sostanze chimiche di sintesi impiegate nei farmaci tra cui quelli ad azione psico-attiva.

Gli embrioni cefalopodi sono quindi esposti a elementi in traccia disciolti nell'acqua del mare durante il loro sviluppo, fase che rappresenta circa il 10-15% della durata della vita di una specie di cefalopode. Studi recenti hanno dimostrato che nel caso delle uova di seppia – caratterizzate da “gusci” e corion resistenti – le concentrazioni di metalli in traccia nei tessuti di questi organismi risultano essere relativamente bassi, indipendentemente dalla durata dell'esposizione sperimentale. In contrasto, le uova di *Octopus* sono protette esclusivamente dalla membrana corionale e accumulano elevati livelli di metalli in traccia sia direttamente sia attraverso l'assorbimento attraverso il bio-accumulo nel sacco vitellino, sia attraverso le concentrazioni assorbite per assorbimento diretto per esposizione.

L'accumulo di metalli in traccia nei tessuti degli animali ha effetto diretto durante l'embriogenesi, ma si ritiene possano avere effetti tossici nelle fasi giovanili.

Risulta evidente che tali effetti hanno un impatto durante tutto lo sviluppo dell'animale, e possono risultare particolarmente critici per il successo del “reclutamento” della popolazione di tali specie.

## OBIETTIVO

L'obiettivo generale è consistito nel valutare gli effetti della concentrazione di mercurio in diversi tessuti di due specie di cefalopodi (polpi, *Octopus vulgaris*; seppie, *Sepia officinalis*) ottenuti dal pescato locale, essendo questi animali parte integrante della dieta tradizionale delle popolazioni del sud dell'Europa. Polpi e seppie infatti rappresentano una rilevante quota nel mercato di prodotti ittici in Mediterraneo, Europa e nel resto del Mondo. Un obiettivo collaterale di questo studio è stato quello di poter stabilire valori stimati di concentrazione di mercurio e suoi metaboliti in tessuti di cefalopodi in Tirreno (Golfo di Napoli) potendo così contribuire alla creazione di un network internazionale che possa contribuire ad uno studio “epidemiologico” sull'impatto delle concentrazioni di metalli pesanti e in traccia, tra cui il mercurio, su alcune specie chiave del pescato mondiale, quali proprio polpi e calamari.

Costruire una rete internazionale contribuisce non solo a consolidare i rapporti di collaborazione scientifica, ma anche a rafforzare ed estendere al di fuori dei confini dei singoli laboratori alcuni obiettivi che possono risultare di grande interesse a scala sovra-nazionale. In questo senso il contributo



del gruppo di ricerca alla SZN si pone come nodo di una rete di collaborazioni coordinate con il solo obiettivo di condividere dati e risultati scientifici di primaria importanza.

## METODO

Esemplari di seppie e polpi sono stati ottenuti da pescatori del Golfo di Napoli e immediatamente trasportati in laboratorio dove sono stati pesati, misurati lunghezza totale, lunghezza del mantello e valutato lo stato di maturità sessuale, dove possibile. In totale 50 animali (30 esemplari di polpo e 20 di seppia, sex ratio 1:1) del peso variabile tra 200g e 1kg sono stati utilizzati per questo studio preliminare

I tessuti analizzati sono stati: braccia, mantello, ghiandola digestiva, cuori brachiali, branchie e gonadi. Prima della determinazione della concentrazione di mercurio tutti i campioni sono stati congelati a -20°C in sacchetti di plastica etichettati. Per procedere all'analisi i campioni sono stati polverizzati congelati in un mortaio con pestello. I campioni sono stati quindi conservati e trasferiti nei laboratori dei collaboratori internazionali (Portogallo o Francia) dove aliquote variabili tra 5 a 15 mg di ciascun campione sono state analizzate a mezzo di un "Advanced Mercury Analyser spectrophotometer (Altec AMA 254). In breve, la determinazione della concentrazione dei metalli in traccia avviene mediante evaporazione del mercurio a 800°C sotto flusso di ossigeno per 3 min e successiva amalgamazione su rete d'oro; successivamente la rete è stata riscaldata per liberare il mercurio raccolto che è stato poi misurato spettrofotometricamente mediante assorbimento atomico UV. Ogni campione è stato analizzato in triplicato per assicurare la consistenza dei dati. I risultati per ogni tessuto sono dati relativamente al peso secco ( $\text{mg kg}^{-1}$  dry weight). I fattori di conversione applicati per convertire il peso umido a peso secco sono stati: ghiandola digestiva 2.3, cuori brachiali 4.4, branchie, mantello e braccia 5, gonadi 5.5.

## RISULTATI

I livelli di mercurio rinvenuti nei vari tessuti di polpi e seppie sono mostrati in tabella 1. Non sono qui mostrati i singoli valori, né evidenziate le differenze tra maschi e femmine (non significative o apprezzabili) perché lo studio si ritiene parte di uno studio epidemiologico a larga scala che si sta tentando di pubblicare con i collaboratori francesi e portoghesi; è quindi esplicitamente richiesto embargo sui dati completi.

Le concentrazioni più alte risultano essere nei tessuti di ghiandola digestiva. Non risultano esserci differenze significative relativamente al peso, condizione e stato riproduttivo.



Tabella1: Concentrazioni di mercurio nei diversi tessuti espressi in mg kg<sup>-1</sup> peso secco

Specie	Ghiandola digestiva	Cuori brachiali	Branchie	Mantello	Braccia	Gonadi
<i>O. vulgaris</i>	2.01±1.33	0.40 ± 0.05	0.35 ± 0.07	0.37 ± 0.09	0.33 ± 0.09	0.32 ± 0.15
<i>S. officinalis</i>	0.20			0.10		

## CONCLUSIONI

Nel corso degli ultimi anni, il gruppo di ricerca coordinato da Graziano Fiorito alla Stazione Zoologica ha contribuito nella raccolta di dati per la caratterizzazione dei livelli di bio-accumulo di metalli in traccia e di sostanze derivate dall'attività umana allo scopo di individuare le eventuali possibili ricadute sul benessere animale e non da ultimo sulla "biosicurezza". Tale contributo può essere considerato parallelo a studi condotti in Adriatico – per quanto riguarda il Mediterraneo (7, 9) – e l'Atlantico (1, 3, 5, 6) sul bioaccumulo di mercurio e altre sostanze e documenta la presenza di livelli di metalli in traccia in tessuti di animali (polpi, *Octopus vulgaris*; seppie, *Sepia officinalis*) ottenuti dal pescato locale.

Tali ricerche, che non hanno raggiunto - fino ad ora - la sistematicità necessaria per la pubblicazione dei risultati, sono in linea con un analogo studio preliminare condotto alla Stazione Zoologica da D'Aniello e collaboratori nello stesso dipartimento alla SZN (14) diversi anni or sono.

I nostri risultati dimostrano il bio-accumulo di mercurio in diversi tessuti (ghiandola digestiva, mantello e braccia) con valori che possono raggiungere i 3.5 mg/kg di peso secco nella ghiandola digestiva e livelli anche – a seconda degli individui (40 - 3560 ng/g peso secco) – superiori nei fasci muscolari delle braccia di polpi pescati in diverse località del Golfo. I livelli di mercurio riscontrati risultano comunque nei limiti di quelli considerati per il consumo umano. In analogia, il contenuto in seppia appare negli stessi limiti.

I nostri dati confermano altri studi che mostrano che il mercurio si accumula anche nei tessuti muscolari dei cefalopodi probabilmente grazie alla forte affinità con le proteine dei cefalopodi.

Le abbondanze relative differenziali di livelli di mercurio nel tessuto muscolare del mantello verso quello delle braccia è sicuramente una linea di particolare interesse di approfondimento per tali studi considerando la rilevanza per il consumo umano e le caratteristiche biologiche del tessuto.

Il nostro contributo con approcci di *organismal biology*, consente un'analisi ad ampio spettro dei fenomeni che possano essere di rilevanza per il welfare (animale e della qualità del prodotto) nonché fornire indicazioni su modelli di reclutamento delle specie di interesse commerciale in relazione al tasso di "tossicità" ambientale delle sostanze in traccia.



## **SOGGETTI ATTUATORI**

### **1 - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biostrutture e Bioimmagini (CNR-IBB)**

via Mezzocannone, 16, 80134, Napoli

Dr. Menotti Ruvo

Dr. Delia Luongo

Dr. Luca D. D'Andrea

Dr. Luigi Vitagliano

Dr. Roberto Improta

Dr. Nunzianna Doti

Dr. Luciana Esposito

Dr. Stefania de Luca

### **2 - Seconda Università degli Studi di Napoli, Dipartimento di Biochimica Biofisica e Patologia Generale (SUN-DBBPG)**

Prof. Lucia Altucci

Prof. Antimo Migliaccio

Prof. Ernesto Nola

Prof. Anna Maria Molinari

Prof. Gabriella Castoria

Dr. Antonio Bilancio

### **3 - Seconda Università degli Studi di Napoli, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali e Farmaceutiche (SUN-DISTABIF).**

Dr. Angela Chambery

Dr. Antimo Di Maro

Prof. Paolo Pedone

### **4 - Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli (SZN)**

Dr. Adrianna Ianora

Dr. Giovanna Romano

Dr. Graziano Fiorito

Dr. Ylenia Carotenuto

Sig. Mario Di Pinto

### **6 - Università di Napoli Federico II, Dipartimento di Fisica (UNINA-DIPFIS)**

Prof. Carlo Altucci

Prof. Piero Indovina

Prof. Pasquale Maddalena

Napoli 08/03/2016

Responsabile scientifico del Progetto

Dr. Giovanna Romano