

**Ableitung eines vorläufigen Geringfügigkeitsschwellenwertes
für Theobromin (GFS Theobromin)**

**Autoren:
Regine Gühr (HLUG)
Dr. Gerd Rippen (Göttingen)**

Wiesbaden, 15.08.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
2	Stoffdaten	5
2.1	Allgemeine Informationen	5
2.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften:	6
2.3	Bioakkumulation	6
3	Einstufungen	6
4	Ableitung eines Geringfügigkeitsschwellenwertes für Theobromin	7
4.1	Datenrecherche für die Humantoxikologie	7
4.2	Datenrecherche für die Ökotoxikologie	8
4.3	Beurteilung der gesundheitlichen Wirkung von Theobromin auf den Menschen	9
4.3.1	Aufnahme und Resorption	9
4.3.2	Theobromin als Genussmittel, Arzneimittelwirkstoff, Doping- und Futtermittel	10
4.3.2.1	Theobromin als Genussmittel	10
4.3.2.2	Theobromin als Arzneimittelwirkstoff, Doping- und Futtermittel	10
4.4	Toxische Wirkungen von Theobromin	12
4.4.1	Allgemeine toxische Wirkungen	13
4.4.2	Endokrine Wirkungen	15
4.4.3	Reproduktionstoxische Wirkungen	16
4.4.3.1	Schäden an männlichen Fortpflanzungsorganen	16
4.4.3.2	Wirkungen auf Föten und Neugeborene	17
4.4.4	Mutagenität	20
4.4.5	Krebs erzeugende, Krebs fördernde oder Krebs hemmende Wirkung	21
4.4.5.1	Ergebnisse von Langzeitstudien an Labortieren	21
4.4.5.2	Epidemiologische Studien	21
4.4.5.3	Hemmung des Wachstums von Tumoren	22
4.5	Ableitung eines Geringfügigkeitsschwellenwertes GFS _{human} für Theobromin	22
4.6	Zusammenstellung ökotoxikologischer Daten für Theobromin, Coffein und Theophyllin	24
4.6.1	Fische	24
4.6.2	Aquatische Invertebraten	26
4.6.3	Aquatische Pflanzen	28
4.6.4	Amphibien	31
4.6.5	Mikroorganismen	32
4.6.6	Terrestrische Pflanzen	34
4.6.7	Insekten	34
4.7	Ableitung des Sicherheitsfaktors (SF) bei der Festlegung eines PNEC _{aquat} für Theobromin	34
4.7.1	Zusammenstellung des Basisdatensatzes (akute Toxizitäten zu den drei trophischen Ebenen Fische, Wasserflöhe und Algen)	35
4.7.2	Zusammenstellung chronischer Daten	37
4.7.3	Zusammenstellung der sensitivsten Daten	42
4.7.4	Bewertung der Daten und Ableitung des Sicherheitsfaktors (SF)	44
5	Verwendete Literatur	48

1 Zusammenfassung

Theobromin ist der physiologisch wirksame Bestandteil der Kakaobohne und ein Hauptmetabolit des Coffeins. Wegen seiner harntreibenden und gefäßerweiternden Wirkung wurde es schon im 19. Jahrhundert als Arzneimittel eingesetzt. Bei humantoxikologischer Betrachtung können neben den positiven Wirkungen von Theobromin, oft in nur wenig erhöhter Dosierung, Giftwirkungen nachgewiesen werden, die im Tierversuch nach Theobromin-Applikation bis zur irreversiblen Zerstörung der Thymusdrüse und männlicher Geschlechtsorgane sowie zu teratogenen Wirkungen (Skelettveränderungen) in den Nachkommen reichen.

Die niedrigsten Dosen (No-observed adverse effect level, NOAEL) für eine reproduktionstoxische Wirkung von Theobromin in Tierversuchen wurden zwischen 2 und 20 mg/(kgKG-d) ermittelt.

In Säuglingen bewirkte die nach Schokoladenverzehr der Mutter errechnete Theobromin-Dosis von 1-2 mg/(kgKG-d) über die Muttermilch eine Stimulation des Nervensystems, der Harnausscheidung und des Herzmuskels sowie eine Entspannung der glatten Bronchien-Muskulatur.

Eine Krebs erzeugende Wirkung von Theobromin kann nicht ausgeschlossen werden; zwar fehlen angemessene Langzeitstudien an Labortieren für diese Substanz, jedoch gibt es Hinweise auf Prostata- bzw. Hodenkrebs aus zwei epidemiologischen Auswertungen und Hinweise auf eine mutagene Wirkung (Schwester-Chromatid-Austausch und Chromosomenbrüche). Für das chemisch eng verwandte Theophyllin gibt es dagegen Langzeitstudien an Ratten und Mäusen mit negativem Ergebnis.

Aus dem niedrigsten NOAEL 2 mg/(kgKG-d) für reproduktionstoxische Wirkungen von Theobromin an Ratten errechnet sich mit einem Extrapolationsfaktor von 100 (10 für die Übertragung vom Tierversuch auf den Menschen und 10 zur Berücksichtigung empfindlicher Personengruppen) ein GFS_{human} (vorläufig) = 70 µg/L.

Aus der unerwünschten Wirkung von Theobromin auf Säuglinge von 1-2 mg/(kgKG-d) errechnet sich zum Schutz dieser besonders sensiblen Gruppe mit einem Extrapolationsfaktor 10 (für die Übertragung vom Lowest observed adverse effect level (LOAEL) auf einen NOAEL) der Vorschlag für einen vorläufige GFS von

$$GFS_{\text{human}} \text{ (vorläufig)} = 40 \mu\text{g/L.}$$

Die Datenbasis für ökotoxikologische Untersuchungen mit Theobromin ist gering im Vergleich zu einer erheblichen Zahl unterschiedlicher Tests an Coffein. Sowohl an Säugern und beim Menschen als auch in ökotoxikologischen Prüfungen zeigen die strukturverwandten Methylxanthine Theobromin und Coffein gleiche Wirkmechanismen. Deshalb werden die ökotoxikologischen Untersuchungen mit Coffein gleichberechtigt zur Ableitung einer GFS_{aquat} herangezogen.

Als besonders sensibel gegenüber Coffein zeigten sich die vorliegenden chronische Daten der Invertebraten Kalifornische Miesmuschel und Strandkrabbe. Die stärksten Wirkungen an der Strandkrabbe beruhen auf den gleichen Mechanismen wie die Wirkungen von Theobromin und Coffein auf Säugetiere: zum einen auf einer Störung von Enzymfunktionen wie einer Hemmung der Phosphodiesterase, zum anderen auf einer DNA-Schädigung, beobachtet in Mutagenitätstests und an Krebszellen. In den untersuchten Amphibien wurden ebenso wie in den Laborversuchen mit Ratten teratogene Wirkungen von Theobromin und Coffein gleichermaßen beobachtet. DNA-Schädigung und Teratogenität sind deshalb als Substanzgruppenspezifischen Wirkmechanismen anzusehen.

Mit den Tests zur Wirkung des Coffeins auf Invertebraten und Amphibien wurden deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit die sensibelsten Endpunkte der Methylxanthin-Toxizität getestet, so dass der anzusetzende Sicherheitsfaktor reduziert werden kann; angewendet wird daher auf den LOEC-Wert (0,1

µg/L) für die dosisabhängigen DNA-Schäden an der Gemeinen Strandkrabbe ein Faktor 20 statt 50 (mindestens Faktor 10, dazu Faktor 2 zur Extrapolation von LOEC auf NOEC):

GFS_{aquat} (vorläufig) = 5 ng/L.

Der in der gleichen Größenordnung liegende niedrigste LOEC (zellulärer Stress) für die Kalifornische Miesmuschel mit 0,05 µg/L wird hier wegen des weniger populationsrelevanten Endpunktes nicht in erster Priorität berücksichtigt.

Dieser vorläufige GFS sollte abgesichert werden durch zusätzliche nachzufordernde Prüfungsergebnisse zur **Langzeit-Wirkung von Theobromin auf Amphibien und Invertebraten** (an Stelle der Daten zum hier ersatzweise bewerteten Coffein).

Die festgestellte Wirkung „dosisabhängige DNA-Schäden“ von Coffein auf Invertebraten als Substanzgruppen-spezifischer Wirkmechanismus ist derart gravierend, dass ein analoger Test mit der Strandkrabbe auch mit Theobromin als Testsubstanz ausgeführt werden sollte.

Theoretisch ist es sinnvoll einen chronischen Fischttest durchzuführen, der den SF auf 10 reduzieren könnte. Da jedoch die Minimalwerte für NOEC und EC₅₀ nicht auf der trophischen Ebene der Fische zu finden sein werden, kann hierüber der SF von 20 nicht unterschritten werden.

Aus einem Vergleich des vorläufigen GFS zum Schutz des Menschen (GFS_{human} = 40 µg/L, s. Kapitel 3.5) und dem vorläufigen GFS zum Schutz aquatischer Lebewesen (GFS_{aquat} = 2,5 ng/L) resultiert als niedrigerer Wert von beiden der vorläufige Geringfügigkeitsschwellenwert

GFS (vorläufig) = 5 ng/L

2 Stoffdaten

2.1 Allgemeine Informationen

Synonyme:

3,7-Dihydro-3,7-dimethyl-1H-Purin-2,6-dion, 3,7-Dimethylxanthin, Santheose

CA-Bezeichnung:

1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-3,7-dimethyl-

EINECS-Nummer:

201-494-2

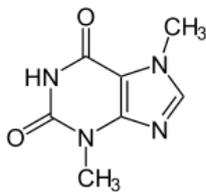
Summenformel:

C₇H₈N₄O₂

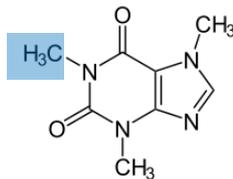
Strukturformeln:

Das Alkaloid Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) ist eng strukturverwandt mit Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin) und Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin).

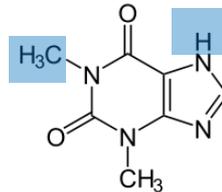
Theobromin und Coffein sind Naturstoffe. Theobromin ist im Menschen und in Säugetieren ein Metabolit des Coffeins, ebenso Theophyllin. Alle drei Verbindungen weisen ähnliche Wirkungen im medizinischen Bereich sowie im toxischen Verhalten gegenüber Menschen auf.



Theobromin
3,7-Dimethylxanthin



Coffein
1,3,7-Trimethylxanthin



Theophyllin
1,3-Dimethylxanthin

CAS-Nummern:

83-67-0

58-08-2

58-55-9

Molare Masse:

180,16 g/mol

194,19 g/mol

180,16 g/mol

Biologischer und abiotischer Abbau:

Mit aerobem Klärschlamm-Inokulum ist Theobromin nach Adaptation leicht abbaubar [Richardson und Bowron 1985]. In 5 Tagen werden nach OECD-Prüfrichtlinie 302 B (Zahn-Wellens-/EMPA-Test) 70 % abgebaut [GSBL a 2014].

Eine Reaktion mit Wasser (Hydrolyse) ist unter Umweltbedingungen nicht wahrscheinlich, da keine hydrolysierbaren Gruppen vorhanden sind [HSDB 2013].

2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften:

Dissoziationskonstante (pK_a -Wert):

10,05, d.h. Theobromin liegt in der Umwelt protoniert (als Kation) vor.

Wasserlöslichkeit:

bei 25 °C: 0,33 g/L (vermutlich nicht protoniert gemessen) (sehr schwer löslich)

Dampfdruck:

bei 25 °C: $1,5 \cdot 10^{-9}$ Pa (berechnet)
(nicht flüchtig)

Henry-Koeffizient $H = c(\text{Luft})/c(\text{Wasser})$:

bei 25 °C: $H = 0,33 \cdot 10^{-12}$ Pa (berechnet)
(nicht flüchtig aus Wasser)

Adsorption:

geringe Adsorption, d.h. sehr hohe Mobilität im Boden, jedoch als Kation Möglichkeit zur Anreicherung an Tonbestandteile und organische Bodenbestandteile [HSDB 2013].
Aus Wasser sowie feuchten und trockenen Böden nicht flüchtig [HSDB 2013].

2.3 Bioakkumulation

Biokonzentrationsfaktor (BCF): in aquatischen Organismen: sehr gering, liegt als Kation vor!

Verteilungskoeffizient n-Octanol/Wasser ($\log P_{ow}$):

-0,78 (nicht akkumulierend; unter Versuchsbedingungen vermutlich protoniert)

3 Einstufungen

D (2014): Wassergefährdungsklasse 1 (schwach wassergefährdend) [UBA 2014]

D (2014): Arbeitsplatzgrenzwert (MAK-Wert) nicht aufgestellt [DFG 2014]

EU (ca. 1999): Theobromin ist aufgeführt in der Liste der Altstoffe, die in Mengen zwischen 10 und 1000 Tonnen jährlich in der Gemeinschaft hergestellt oder in sie eingeführt werden [IUCLID 2000].

EU (2013): gelistet als High Production Volume (HPV) Chemical [ESIS 2013]

Theobromin ist in keiner Prioritätenliste im Rahmen der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates vom 23. März 1993 zur Bewertung und Kontrolle der Umweltrisiken chemischer Altstoffe enthalten [ESIS 2013].
Theobromin ist als HPV(High Production Volume)-Chemikalie aufgeführt [ESIS 2013].

WHO (1991/1997): nicht klassifizierbar hinsichtlich der Karzinogenität am Menschen (Gruppe 3)
In der EU sind Höchstgehalte von Theobromin in Futtermitteln festgelegt, und zwar 300 mg/kg für Alleinfuttermittel und 700 mg/kg für Alleinfuttermittel erwachsener Rinder. Für Milchkühe und Schweine

können bei dieser Konzentration im Futter allerdings bereits Auswirkungen auf die Milchproduktion bzw. schädliche Wirkungen auftreten [EFSA 2008].

Für das strukturverwandte Coffein wurde eine Predicted-no-effect-concentration (**PNEC**) von 0,0199 µg/L = 19,9 ng/L auf Basis einer EC₅₀ (28 d) mit einem Sicherheitsfaktor 1000 abgeleitet [Aguirre-Martínez et al. 2013b]

4 Ableitung eines Geringfügigkeitsschwellenwertes für Theobromin

4.1 Datenrecherche für die Humantoxikologie

Zunächst wurde nach vorliegenden Bewertungen anerkannter Institutionen gesucht. Dazu wurden folgende Informationssysteme genutzt:

- PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)
- Dokumente der OECD:
 - OECD Existing Chemicals Database (<http://webnet.oecd.org/Hpv/ui/Search.aspx>)
 - OECD: The Global Portal to Information on Chemical Substances (http://www.echemportal.org/echemportal/index?pageID=0&request_locale=en)
 - Chemicals Screening Information Data Set (SIDS) for High Volume Chemicals (<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/sidspub.html>) (bis 2007)
- TOXNET ("Databases on toxicology, hazardous chemicals, environmental health, and toxic releases") der United States National Library of Medicine (<http://toxnet.nlm.nih.gov>) mit den Unterdatenbanken
 - TOXLINE (Toxicology Literature Online) (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?TOXLINE>)
 - Hazardous Substances Databank (HSDB) (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)
 - Chemical Carcinogenesis Research Information System (CCRIS)
 - Development and Reproductive Toxicology (DART)
 - Genetic Toxicology (GENETOX)
 - IRIS (Integrated Risk Information System) der U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (<http://www.epa.gov/IRIS/index.html>)
- DIMDI Datenbank des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information (<http://www.dimdi.de/static/de/db/index.htm>) mit den Unterdatenbanken
 - MEDLINE
 - BIOSYS
 - EMBASE
 - EMBASE Alert
 - SciSearch
 - Dt. Ärzteblatt

Keinen Eintrag gab es in

- IRIS (Integrated Risk Information System) der U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (<http://www.epa.gov/IRIS/index.html>)

4.2 Datenrecherche für die Ökotoxikologie

Es wurden die folgenden elektronischen Quellen auf Einzelinformationen zur aquatischen und terrestrischen Toxizität von Theobromin durchsucht:

- ECOTOX (Ecotoxicology), U.S. EPA (http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm)
- ETOX (Informationssystem Ökotoxikologie und Umweltqualitätsziele), Umweltbundesamt (<http://webetox.uba.de/webETOX/index.do>)
- EFSA (European Food Safety Authority) (<http://www.efsa.europa.eu/>)
- Toxicology Data Network (TOXNET) (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) der United States National Library of Medicine mit der Unterdatenbank
 - HSDB (Hazardous Substances Data Bank)
- SCORECARD Chemical Profile (<http://scorecard.goodguide.com/chemical-profiles/>)
- ESIS (European Chemical Substances Information System), European Commission - Joint Research Centre (<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/>)
- Dokumente der OECD:
 - OECD Existing Chemicals Database (<http://webnet.oecd.org/Hpv/ui/Search.aspx>)
 - OECD: The Global Portal to Information on Chemical Substances (http://www.echemportal.org/echemportal/index?pageID=0&request_locale=en)
 - Chemicals Screening Information Data Set (SIDS) for High Volume Chemicals (<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/sidspub.html>) (bis 2007)
- World Health Organization (WHO) (<http://www.who.int/en/>) mit
 - IARC (International Agency for Research on Cancer), WHO (<http://www.iarc.fr/>)
- NTP (National Toxicology Program), (U.S. Department of Health and Human Services) (<http://ntp-server.niehs.nih.gov/>)
- STN Easy der STN International, betrieben von Fachinformationszentrum Karlsruhe und Chemical Abstracts Service, Columbus, OH (<http://www.stn-international.de>) mit zahlreichen Unterdatenbanken wie insbesondere
 - CAplus (Toxicology focus) Datenbank
 - Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) Datenbank
 - TOXCENTER Datenbank
- Toxicological Profile Information Sheet, United States - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (U.S. ATSDR) (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>)
- REACH/ECHA (European Chemicals Agency) (<http://echa.europa.eu/information-on-chemicals/>)

Keinen Eintrag gab es in

- Toxicological Profile Information Sheet, United States - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (U.S. ATSDR) (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>)
- REACH/ECHA (European Chemicals Agency) (<http://echa.europa.eu/information-on-chemicals/>)

4.3 Beurteilung der gesundheitlichen Wirkung von Theobromin auf den Menschen

(Grau unterlegte Studien werden zur Ableitung herangezogen.)

4.3.1 Aufnahme und Resorption

Der Mensch nimmt Theobromin hauptsächlich aus Schokoladenwaren, Kakaotränken und kakao- und schokoladehaltigen Backwaren auf; weiter entsteht es im Körper nach Metabolisierung von Coffein (u.a. aus dem Verzehr von Kaffee, Tee u.a.). Im Vergleich zum direkten Verzehr von Kakaoprodukten ist die Aufnahme von Theobromin aus Tierprodukten wie Fleisch, Milch und Eiern vernachlässigbar [EFSA 2008]. Die **mittlere tägliche Aufnahmemenge** des Menschen aus Nahrung und Getränken in den USA wird auf 39 mg/d geschätzt, umgerechnet¹ **ca. 0,56 mg/(kgKG-d) Theobromin**.

Nach einer konservativen Schätzung kann der Genuss von täglich **100 g schwarzer Schokolade** mit einem maximalen Theobromin-Gehalt von 6300 mg/kg in einer 60 kg schweren Person eine Exposition von **10,5 mg/(kgKG-d)** bedeuten [EFSA 2008].

Theobromin wird im Körper gut absorbiert, umfassend verteilt und schnell verstoffwechselt. Unverändertes Theobromin und seine Metabolite werden hauptsächlich im Urin ausgeschieden.

Im Menschen werden Methylxanthine vom Enzym Cytochrom P 450 durch Demethylierung metabolisiert, d.h. Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) entsteht aus Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin) und wird selbst vorrangig weiter abgebaut zu 3- und 7-Methylxanthin. Die folgenden Metaboliten von Theobromin wurden in menschlichem Urin identifiziert [Tarka 1982, WHO (1991/97)]:

- 7-Methylxanthin (28-30 %, 34-48 %),
- 3-Methylxanthin (14-21 %, 20 %),
- 7-Methylharnsäure (7-12 %),
- 6-Amino-5-(N-methylformylamino)-1-methyluracil (6-9 %),
- 3,7-Dimethylharnsäure (1 %),
- (unverändertes Theobromin 11-12 %)².

Der weitere Abbau erfolgt über

- Xanthin und
- Harnsäure zu
- Allantoin(säure) mit anschließender
- Mineralisierung [EFSA 2008].

Theobromin durchdringt auch die Blut-Hirn-Schranke [WHO 1991/97; EFSA 2008; Skopiński et al. 2011], die Übergangsmenge und Geschwindigkeit der Metabolisierung sind altersabhängig: Das Theobromin-Konzentrationsverhältnis Gehirn:Blut in Ratten nahm von 0,96 bei der Geburt in 30 Tagen auf 0,60 ab [WHO 1991/97].

Theobromin geht leicht in die Muttermilch über und kann zu physiologischen Wirkungen im Säugling führen (s. Abschnitt 3.4.3.2); Neugeborenen fehlt das Enzym Cytochrom P 450, so dass die Entgiftung verzögert ist [Skopiński et al. 2011]. Kinder in fortgeschrittenem Alter haben dagegen im Vergleich zu Erwachsenen eine beschleunigte Metabolisierung.

¹ für ein mittleres Gewicht von 70 kg

² In trächtigen Ratten und Kaninchen erhöhte sich die unveränderte Theobromin-Ausscheidung von 35 % bzw. 39 % auf mehr als 50 % [WHO 1991/97]

4.3.2 Theobromin als Genussmittel, Arzneimittelwirkstoff, Doping- und Futtermittel

Theobromin hat wie die anderen Methylxanthine Coffein oder Theophyllin physiologische Wirkungen als Genussmittel (Kakao, Schokolade) und als Arzneimittel (vor allem historisch), jedoch im Menschen und in Tieren auch gravierende toxische Wirkungen. Die Wirkungen als Genussmittel sind im Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben, die wesentlichen pharmakologischen Einsatzbereiche sowie die Verwendung als Doping- und Futtermittel im Abschnitt 3.3.2.2.

4.3.2.1 Theobromin als Genussmittel

Die Wirkung von Theobromin auf den menschlichen Organismus ähnelt der des Coffeins, ist aber deutlich schwächer. Als schwacher Adenosinrezeptor³-Antagonist (Adenosinrezeptor-Hemmer) hat Theobromin eine geringe stimulierende Wirkung auf das Zentralnervensystem und erhöht die Herzfrequenz. Anders als Coffein wirkt es mild und dauerhaft anregend, aber auch stimmungsaufhellend [Kelich 2013; Smit 2011].

An Freiwilligen (n=80) getestete Theobromin-Dosen von einmalig 500 bzw. 1000 mg (ca. **7 bzw. 14 mg/(kgKG-d)**) wirkten negativ auf die Stimmung; 250 mg zeigten nur begrenzte subjektive Effekte. Die Herzfrequenz stieg mit der Dosis [Baggott et al. 2013].
(Anmerkung: Diese Dosis von LOAEL = 7 mg/(kgKG-d) liegt im Bereich einer 100g-Tafel schwarzer Schokolade)

4.3.2.2 Theobromin als Arzneimittelwirkstoff, Doping- und Futtermittel

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurde Theobromin als Inhaltsstoff des Kakaos identifiziert und therapeutisch eingesetzt [Schaarschmidt 2008]. Im Folgenden werden die wichtigsten Verwendungsbereiche dargestellt.

Diuretikum

Wegen der harntreibenden Wirkung wurde Theobromin seit ca. 1885 als erstes Diuretikum und eines der bedeutendsten Medikamente seiner Zeit eingesetzt. Der Dosierungsbereich liegt bei 300-600 mg, die Tagesmaximaldosis bei 3000 mg, entsprechend ca. 150-300 Tassen Tee, 60-100 g dunkler Schokolade oder 170-340 g Milkschokolade [Schaarschmidt 2008].

Therapie von Herzinsuffizienz

Die Therapie von Herzinsuffizienz war Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts eine der wesentlichen klinischen Anwendungsgebiete von Theobromin-Derivaten. Dabei wirkt Theobromin gleichzeitig auf die Herzmuskulatur (positive Inotropie), lindert die Atemnot durch seine bronchodilatierende Wirkung, verbessert die Kreislaufeffizienz (dadurch Reduktion von Lungenödem) und verstärkt die Diurese zur Entlastung des Herzens [Schaarschmidt 2008].

³ Adenosin blockiert die Ausschüttung aller belebenden und aktivierenden Neurotransmitter wie zum Beispiel Dopamin, Acetylcholin oder Noradrenalin. Dies bewirkt eine Dilatation (Weitung der Blutgefäße), wodurch der Blutdruck sinkt. Adenosin verringert außerdem die Herzfrequenz und verlängert die Überleitungszeit im AV-Knoten des Herzens.

Behandlung von Herzrhythmusstörungen

Bereits 1920 wurde Theobromin erfolgreich zur gezielten Behandlung von Herzrhythmusstörungen eingesetzt (die chemisch verwandten Methylxanthine Coffein und Theophyllin zeigten eine gegenteilige Wirkung). Der klinische Einsatz von Theobromin für diese Therapie war allerdings sehr begrenzt [Schaarschmidt 2008].

Durchblutungsförderung (Vasodilatation)

Bis 1950 wurde Theobromin zur Behandlung von Angina pectoris⁴ eingesetzt, dann aber durch organische Nitroverbindungen wie Glycerintrinitrat oder Theophyllin abgelöst [Schaarschmidt 2008].

In den meisten Untersuchungen zeigte Theobromin eine positive therapeutische Wirkung auf die periphere arterielle Durchblutung, unter anderem bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit⁵. Zusätzlich kann Theobromin langfristig den Cholesterinspiegel senken (bzw. den schützenden HDL-Cholesterin-Spiegel erhöhen), was sich positiv auf die Arteriosklerose, die so genannte „Arterienverkalkung“ auswirkt [Schaarschmidt 2008; Neufingerl et al. 2013].

Asthma- und Hustentherapie

Theobromin führt (wie Theophyllin und auch Coffein) zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur der Bronchien und verbessert die Atmung durch die Bronchienerweiterung („Bronchodilatation“) erheblich. Dies führte zur Verwendung in der Asthma-Therapie; Theobromin wurde jedoch Anfang des 20. Jahrhunderts durch Theophyllin verdrängt [Schaarschmidt 2008].

Wie Codein besitzt Theobromin eine hustenhemmende (antitussive) Wirkung, jedoch mit weniger Nebenwirkungen (wie Müdigkeit, Rauschzustände oder Suchtpotenzial) [Usmani et al. 2005].

Einsatz zur Leistungssteigerung, als Doping- und Futtermittel

In Ergometrie-Tests von 1901 konnte die Arbeitsleistung nach Einnahme von Theobromin um bis zu 70 % gesteigert werden, und die Müdigkeit war deutlich geringer. Bei Langzeit-Ergometrien trat allerdings eine schnellere Ermüdung ein [Schaarschmidt 2008].

In einer Doppel-Blind-Studie zeigten bereits 60 g schwarze Schokolade (250 mg Theobromin und 19 mg Coffein) eine signifikante Verbesserung verschiedener kognitiver Fähigkeiten [Smit et al. 2004].

Wegen der Leistungssteigerung durch die stimulierende Wirkung wird Theobromin bei Hunde-, Kamel- und Pferderennen als Dopingmittel eingesetzt [Smit 2011].

Vor allem als Futterzusatz für Rinder werden Kakaobohnenschalen, Kakaobohnenmehl, Kakaokeime und verworfene Konditorwaren in Europa verwendet [EFSA 2008]; dies erhöht vor allem im Winter den Vitamin-D-Spiegel in den Tieren [Smit 2011]. Der Milchfettgehalt wird durch kakaohaltigen Futterzusatz bei Kühen ebenfalls erhöht [Smit 2008].

⁴ Angina pectoris (Brustenge, Herzschmerz): anfallsartiger Schmerz in der Brust in Folge einer vorübergehenden Durchblutungsstörung des Herzens

⁵ Die periphere arterielle Verschlusskrankheit entsteht durch Einengung oder Verschluss der die Extremitäten versorgenden Arterien oder seltener der Hauptschlagader (Aorta). Hauptursache ist die Arteriosklerose.

Entzündungshemmung

Die entzündungshemmenden Eigenschaften von Theobromin (und seines Metaboliten 3-Methylxanthin [Stavric 1988]) beruhen auf der Hemmung der Erythrozyten-Phosphodiesterase. Zusammengefaßt sind auch die anderen Methylxanthine Coffein und Theophyllin sowie der Arzneimittelwirkstoff Pentoxifyllin, ein Theobromin-Derivat, Phosphodiesterase-Hemmer⁶. Besonders Theophyllin ist wegen seiner entzündungshemmenden Eigenschaft bekannt.

Theobromin zeigt eine starke Hemmwirkung auf das Enzym Poly(ADP-Ribose)polymerase-1 (PARP-1), das für akute und chronische Entzündungen verantwortlich gemacht wird; es wurde deshalb zur therapeutischen Behandlung von Gefäß-Fehlfunktionen und Entzündungen empfohlen [Smit 2011].

Nach einer U.S.-amerikanischen Studie an mehr als 2000 Schwangeren kann der Genuss von Schokolade das Risiko von Präeklampsie bei Schwangeren senken. Leitsymptome dieser Erkrankung sind Ödeme, Bluthochdruck und Proteinurie (Eiweiß im Urin), außerdem Schwindel und Kopfschmerzen, Benommenheit, Sehstörungen wie Augenflimmern sowie Übelkeit und Erbrechen. Die Anzahl der Frauen mit entsprechenden Symptomen war direkt negativ abhängig vom Spiegel des in der Schokolade enthaltenen Theobromin im Serum [Triche et al. 2008].

Weitere therapeutische Einsatzmöglichkeiten

Als positive Wirkung von Theobromin wird auch die Hemmung von Zahnkaries beschrieben und die Substanz als Zusatz in Zahnpasta empfohlen [Smit 2011]. Von Kargul et al. (2012) wurde aktuell die Verbesserung der Zahnschmelzhärte und von Amaechi et al. (2013) die Neubildung von Zahnschmelz unter Theobromin-Einwirkung festgestellt.

Wegen seiner Hemmwirkung auf die Neubildung von (in diesem Fall) krankhaften Blutgefäßen wurde Theobromin in der Augenheilkunde zur Therapie von proliferativer Retinopathie⁷ vorgeschlagen [Skopiński et al. 1993].

Theobromin ist wie die anderen Methylxanthine ein Radikalfänger [León-Carmona und Galano 2012]. Ob diese Eigenschaft mit positiven oder negativen physiologischen Wirkungen verknüpft ist, wird in der Literatur nicht diskutiert.

4.4 Toxische Wirkungen von Theobromin

Neben den positiven Wirkungen von Theobromin kann Theobromin, oft in nur wenig erhöhter Dosierung, Giftwirkungen entfalten, die im Tierversuch nach Theobromin-Applikation bis zur irreversiblen Zerstörung der Thymusdrüse und männlicher Geschlechtsorgane sowie zu teratogenen Wirkungen (Skelettveränderungen) in den Nachkommen reichen. Im Folgenden (Abschnitt 3.4.1) werden zunächst im Text allgemeine toxische Wirkungen auf den Menschen, Labor- und Haustiere dargestellt. Die wichtigsten Untersuchungen an Labortieren und an Haustieren mit Theobromin (rein) oder kakaohaltigem Futter fassen die **Tabellen 1 und 2**

⁶ Der Abbau von cyclischem Adenosinmonophosphat, cAMP, zu AMP (Adenosinmonophosphat) wird durch das Enzym Phosphodiesterase katalysiert. Eine Hemmung dieses Enzyms lässt somit die cAMP-Konzentration im Körper ansteigen.

⁷ durch die Zuckerkrankheit Diabetes mellitus hervorgerufene Erkrankung der Netzhaut des Auges mit zunehmender Schädigung kleiner Blutgefäße

zusammen. Schädigungen der Thymusdrüse sind im Abschnitt 3.4.2 (Endokrine Wirkungen) beschrieben, die reproduktionstoxischen Wirkungen von Theobromin im Abschnitt 3.4.3.

Der Abschnitt 3.4.4 enthält eine Aufstellung der erbgutschädigenden (mutagenen) Wirkungen von Theobromin (u.a. Chromosomenschädigungen), Abschnitt 3.4.5 befasst sich mit einer epidemiologisch abgeleiteten möglicherweise Krebs erzeugenden Wirkung von Theobromin im Fötus und andererseits der Theobromin-induzierten Hemmung des Wachstums bösartiger Tumore, allein oder in Verbindung mit Zytostatika

4.4.1 Allgemeine toxische Wirkungen

Eine hohe tägliche Aufnahme von 50-100 g Kakao (0,8-1,5 g Theobromin) über einen Zeitraum von 10 Tagen verursachte bei Menschen starke Kopfschmerzen, Schweißausbrüche und Zittern [WHO 1991/97]. Bei einer oralen Aufnahme von 3x200 mg in 24 Stunden zeigten sich bei Freiwilligen keine klinischen Symptome oder pharmakologische Aktivität. In einer anderen Studie hatte die Aufnahme von 6 mg/(kgKG-d) Theobromin mit Schokolade ebenfalls keinen Einfluss auf klinische Parameter [WHO 1991/97]. In hoher Dosierung kann Theobromin wie Coffein einen Rauschzustand auslösen, besonders in Kombination mit Coffein [Kelich 2013]. Große Dosen Theobromin sollen auch Übelkeit und Anorexie (Magersucht) bewirken [EFSA 2008].

Menschen besitzen ebenso wie Ratten und Mäuse ein Enzym, das Theobromin im Körper abbaut. Bei Hunden, Katzen oder Pferden fehlt dieses Enzym; sie bauen Theobromin somit wesentlich langsamer ab (Plasmahalbwertszeit für Hunde ca. 17 Stunden im Vergleich zu 6-10 Stunden [IARC 1991] beim Menschen), weshalb Theobromin für diese Tiere eher tödlich sein kann. Die orale letale Dosis (der LD₅₀-Wert) für Ratten liegt bei 950 mg/kg KG, für Hunde bei 300 mg/kg KG [EFSA 2008].

In den nachfolgenden Tabellen 1 und 2 sind die Wirkungen von Theobromin auf Labor- und Haustiere mit den korrespondierenden niedrigsten toxisch wirksamen Körperdosen (**lowest observed adverse effect levels, LOAEL**) und die Körperdosen ohne toxische Wirkung (**no-observed adverse effect levels, NOAEL**) zusammengefasst.

Die niedrigsten Werte liegen in der Größenordnung von **2-20 mg/(kgKG-d)**.

In den folgenden Abschnitten sind die wichtigsten Endpunkte toxischer Wirkungen ausführlich dargestellt:

- endokrine Wirkungen (Abschnitt 3.4.2)
- reproduktionstoxische Wirkungen (Abschnitt 3.4.3)
- erbgutschädigende (mutagene) Wirkungen (Abschnitt 3.4.4)
- Wirkungen auf das Wachstum von Tumoren (Abschnitt 3.4.5)

Tabelle 1: Toxizität von Theobromin in Labortieren

Spezies	Expositions- dauer (d)	Applikation	LOAEL/ NOAEL	Dosis	Zielorgan, Endpunkte	Bemerkung	Literatur
Ratte ♂	365		NOAEL	150	Testes	nur in Review	EFSA 2008
Ratte ♂	> 28	Futter	LOAEL	300	Testes		mehrere; EFSA 2008
Ratte ♂	448	Futter	LOAEL	250	Testes		Friedman et al. 1978; EFSA 2008
Ratte ♂	133	Futter	LOAEL	250	Testes		Friedman et al. 1978; EFSA 2008
Ratte ♂	31	Schlundsonde	LOAEL	250	Testes		Wang et al. 1992
Ratte ♂	31	Schlundsonde	LOAEL	250	Testes	Kakao-Extrakt	Wang et al. 1992
Ratte ♂	31	Schlundsonde	NOAEL	50	Testes	Kakao-Extrakt	Wang et al. 1992
Ratte ♂	31	Schlundsonde	NOAEL	28	Testes	aus Kakao-Extrakt umger. auf rein üb. Serumspiegel	Wang et al. 1992
Ratte ♂	28	Schlundsonde	LOAEL	250	Testes	rein	Funabayashi et al. 2000
Ratte ♂	49	Futter	NOAEL	90-140	Testes	rein	Tarka et al. 1981
Ratte ♀	6.-19. Tag d. Trächtigkeit	Futter	NOAEL	53	Skelettveränderungen	rein	Tarka et al. 1986a; IARC 1991
Ratte ♂ und ♀	3 Generationen; 1. Generation 84 d	Futter	NOAEL	104/126	Reproduktionstoxizität	Kakaopulver; Methylxanthine, d.h. inkl. Coffein-Gehalt	Hostetler et al. 1990 Tarka et al. 1986a IARC 1991
Ratte ♂ und ♀	126 (Reprotox- Studie)	Futter	LOAEL	126	Reproduktionstoxizität	rein	Lamb et al. 1997; EFSA 2008
Ratte ♂ und ♀	28 und 49	Futter	LOAEL	50/300	Thymus	rein	Tarka et al. 1979; Gans 1982, 1984; IARC 1991, EFSA 2008
Ratte ♀	Trächtigkeit und Säugedauer	Trinkwasser	NOAEL/LOE	2	Nahrungsaufnahme, Körpergewicht der Nachkommen, Milchproduktion und - qualität	rein	Hart und Grimble 1990; EFSA 2008
Maus ♀	Trächtigkeit und Säugedauer	Trinkwasser	LOAEL	140	Körpergewicht, Skelettveränderungen	Schokolade	Skopinski et al. 2003; EFSA 2008
Maus ♂ und ♀	28 und 49	Futter	LOAEL	1840	Thymus	rein	Tarka et al. 1979; EFSA 2008
Maus ♀	Trächtigkeit	Futter	LOAEL	100	Immun-Parameter d. Nachkommen	rein	Chorostowska-Wynimko et al. 2004
Maus ♀	Trächtigkeit	Futter	LOAEL	300	Skelettveränderungen d. Nachkommen	rein	Chorostowska-Wynimko et al. 2004
Kaninchen ♀	6.-29. Tag d. Trächtigkeit	Futter	NOAEL	21	Skelettveränderungen d. Nachkommen	rein	Tarka et al. 1986b; EFSA 2008
Kaninchen ♀	6.-29. Tag d. Trächtigkeit	Futter	NOAEL	25	Skelettveränderungen d. Nachkommen	Kakao-Pulver; Methyl- xanthine, d.h. inkl. Coffein- Gehalt	Tarka et al. 1986b; EFSA 2008
Kaninchen ♂	120	Futter	LOAEL	250	Mortalität, Herz, Thymus, Testes	rein	Cometti et al. 2003; EFSA 2008
Hamster ♂ und ♀	28 und 49	Futter	LOAEL	850	Thymus	rein	Tarka et al. 1979; EFSA 2008

Tabelle 2: Toxizität von Theobromin in Haustieren

Spezies	Expositions- dauer (d)	Applikation	LOAEL/ NOAEL	Dosis	Zielorgan, Endpunkte	Bemerkung	Literatur
Milchkuh	12-365	Futter	LOAEL	15	verringerte Milchproduktion, erhöhter Milchfettgehalt	Kakaoschalen, Kakaobohnenmehl oder	EFSA 2008
Milchkuh	12-31	Futter	NOEL	55	toxische Wirkungen	rein	EFSA 2008
Milchkuh	ca. 220	Futter	NOAEL	23	Milchleistung, Fettgehalt der Milch, Geschmack, Verdauung	Kakaoschalen	EFSA 2008
Kalb	> 14	Futter	LOAEL	45-90	Aufgeregtheit, Schwitzen, erhöhte Atem- und Herzraten	Schokoladen-Abfälle	EFSA 2008
Ziege	56	Futter	LOAEL	300	Futteraufnahme und KG		EFSA 2008
Lamm	90	Futter	NOAEL	35	Futteraufnahme und KG		EFSA 2008
Schaf	5	Futter	LOAEL	50	Futteraufnahme und KG		EFSA 2008
Pferd	Einzeldosis		NOAEL	0,5	klinische oder biochemische Wirkungen		EFSA 2008
Schwein	126	Futter	LOAEL	12-70	Wachstumsverzögerung, Lethargie, Diarrhoe	Kakaomehl, z. T. enttheobromiert	EFSA 2008
Schwein	50	Futter	NOAEL	87	Gewicht, Lebergewicht	Kakaomehl	EFSA 2008
Schwein	168	Futter	LOAEL	50	Wachstumsverzögerung	Kakaomehl (inkl. Coffein 25 mg/(kg KG · d)	EFSA 2008
Schwein	168	Futter	LOAEL	80	Mortalität, Wachstumsverzögerung, Lethargie, Diarrhoe	Kakaomehl (inkl. Coffein 40 mg/(kg KG · d)	EFSA 2008
Jungschwein	14-35	Futter	NOAEL	7	Wachstumsentwicklung	Nebenprodukt der Milchsokoladenproduktion	EFSA 2008
Junghähnchen	Alter 28-42	Futter	LOAEL	95	Wachstumsentwicklung	Kakaoschalenmehl, enttheobrominiert	EFSA 2008
Junghähnchen	Alter 1-24	Futter	NOAEL	26-39	Wachstumsentwicklung	Kakaoschalenmehl	EFSA 2008
Huhn	Alter 1-63	Futter	NOAEL	110-165	Nahrungsaufnahme	"Kakaobohnenkuchen"	EFSA 2008
Legehenne	120	Futter	LOAEL	160	Gewicht, reduzierte/s Eiproduktion, -gewicht	Kakaoschalenmehl	EFSA 2008
Legehenne	200	Futter	LOAEL	160	Mortalität, Nahrungsaufnahme, Eiproduktion	Kakaoschalen	EFSA 2008
Legehenne	200	Futter	LOAEL	80	Diarrhoe	Kakaoschalen	EFSA 2008
Legehenne	175	Futter	LOAEL	66	verzögerter Start der Eiproduktion	Kakaobohnenmehl	EFSA 2008

4.4.2 Endokrine Wirkungen

Wesentliches Zielorgan der endokrinen (hormonartigen) Wirkung von Methylxanthinen wie Theobromin ist der **Thymus**⁸ und – in Folge einer Schädigung dieses Organs mit Verringerung der Produktion von T-Lymphozyten – eine **Schwächung der Immunabwehr in Menschen und Säugetieren**.

In Ratten, Hamstern und Mäusen wurde eine vollständige Atrophie (Gewebeschwund) des Thymus bei hohen Dosen von 250-500 mg/kg KG, 850 mg/kg KG bzw. 1840-1880 mg/kg KG beobachtet. Die Wirkung war weitgehend irreversibel [WHO 1991/97].

Reife männliche Kaninchen erhielten über 120 Tage Theobromin-Dosen von 0,5, 1 und 1,5 % im Futter (geschätzt ca. 250, 500 und 750 mg/(kgKG·d) [EFSA 2008]). Alle Gruppen mit Theobromin-Applikation zeigten dosisabhängige hohe und rasche Mortalität infolge Herzversagens (4 von 8, 7 von 8 und 7 von 8

⁸ Thymus: beim Menschen zweilappiges Organ oberhalb des Herzens. Im Thymus werden Thymozyten (Prä-T-Lymphozyten) in T-Lymphozyten, eine Gruppe weißer Blutkörperchen, umgewandelt. Diese sind wichtige Bestandteile der Immunabwehr.

Tieren, Kontrolle 1). Theobromin bewirkte deutliche Veränderungen an Herz, Thymus und Hoden in allen drei Gruppen [Soffiatti et al. 1989].

In Ratten, denen 2-10 g Theobromin je kg Futter über 4 Wochen in zwei Studien bzw. 7 Wochen in einer dritten appliziert worden waren (90-140 bzw. 215-290 mg/kg KG in Männchen bzw. Weibchen), zeigte sich eine signifikante absolute und relative Abnahme der Thymus-Gewichte mit Verlust von Rinden-Lymphozyten [EFSA 2008; Tarka et al. 1979; Gans 1982, 1984].

In Hamstern und Mäusen wurde ein verringertes Thymus-Gewicht erst bei der höchsten Dosis von 10 g je kg Futter beobachtet [EFSA 2008, Tarka et al. 1979]. In den applizierten Hamstern gab es keine anomalen histologischen Veränderungen; einige Mäuse der höchsten Dosis starben vor dem Ende der Studie [EFSA 2008].

Von Bishop et al. (1988) wurde in männlichen Bewohnern von Utah (n=155 Zwillingspaare) ein niedrigerer Plasma-Gehalt des Steroids Andostandiol⁹ (als Glukuronid) mit steigendem Theobrominspiegel beobachtet. Die gleiche Korrelation zeigte sich allerdings auch mit Coffein und der Kalorienaufnahme.

4.4.3 Reproduktionstoxische Wirkungen

4.4.3.1 Schäden an männlichen Fortpflanzungsorganen

In mehreren unabhängigen Versuchen an männlichen Ratten wurden erhebliche irreversible Schädigungen der Hoden (Testes) festgestellt, die Aspermatogenese (keine Spermienbildung) zur Folge hatten:

Die chronische Applikation von 5 g/kg Theobromin im Futter über 64 Wochen (zu Beginn 3 Wochen mit 10 g/kg) an männlichen Ratten entsprechend ca. **250 mg/(kgKG-d)** führte zu starker Atrophie der Hoden und Aspermatogenese in 94 % bzw. 82 % der Tiere [Friedman et al. 1979; IARC 1991; EFSA 2008]. In einer weiteren Studie über 19 Wochen an einem anderen Ratten-Stamm wurde dieses Ergebnis bestätigt (100 % Hoden-Atrophie bzw. 79 % Aspermatogenese, zusätzlich Erhöhung des Testosteronspiegels) [Friedman et al. 1978].

An männlichen Ratten reichten **250 und 500 mg/(kgKG-d)** Theobromin, verabreicht mit der Schlundsonde über 4 bzw. 2 Wochen aus, um schwere Hoden-Schäden hervorzurufen [Funabashi et al. 2000].

Weitere Studien bestätigen die Wirkungen von Theobromin auf die männlichen Reproduktionsorgane von Ratten [Tarka et al. 1979, 1981; Gans 1984]. Die Exposition variierte von 2 bis 10 g je kg Futter entsprechend 90-140, 215-290, 310-380 420 und 490-560 mg/(kgKG-d) über 4 bis 8 Wochen [EFSA 2008]. Eine erhebliche Hodenschädigung wurde bei Dosierungen ab 300 mg/(kgKG-d) über mindestens 4 Wochen festgestellt [EFSA 2008]. Die Testes-zerstörende Wirkung von Theobromin war bei 6 g/kg und 8 g/kg Theobromin im Futter über 7 Wochen irreversibel [Tarka et al. 1981]. Aus dem letzteren Versuch (7 Wochen) lässt sich für die Ratte in Bezug auf Hodenschäden ein **No-observed-adverse-effect-level (NOAEL)** von 2 g/kg im Futter (**90-140 mg/(kgKG-d)**) ableiten.

Auch von Wang et al. (1992) wurden Körpergewichtsabnahme und Veränderungen der Hoden (Testes) bei Schlundsonden-Applikation von täglich 250 mg Theobromin je kg KG über 31 Tage an männlichen Ratten beobachtet. Die gleichen Hoden-Schäden zeigten sich bei Applikation der gleichen Theobromin-Dosis in

⁹ 3- α -Androstadiol ist ein Hauptmetabolit von Testosteron und Dihydrotestosteron

Form eines Kakao-Extraktes, jedoch in signifikant niedrigerer Intensität. Keine Hoden-Veränderungen bewirkte eine Kakao-Extrakt-Dosis von 50 mg/kg KG.

In einer weiteren Studie [Wang und Waller 1994] mit 500 mg/kg KG Theobromin über 7 Tage zeigten sich an männlichen Ratten ebenfalls Veränderungen der Hoden und ihrer Funktion. Eine Schädigung der Sertoli-Zellen¹⁰ wurde als primäre Wirkung des Theobromins identifiziert. Eine Applikation von Kakao-Extrakt mit äquivalenter Theobromin-Menge blieb ohne Wirkung; die Theobromin-Konzentration in Serum und Testes in diesen Tieren lag 1,8- bzw. 1,6-fach niedriger als bei Verabreichung reinen Theobromins. Der Kakao-Extrakt verringert also die Wirkung des Theobromins, welches mutmaßlich über das Serum in die Organe gelangt, um den Faktor 1,8, anders formuliert: 50 mg/(kgKG-d) im Extrakt bewirken (berechnet) die gleichen Schäden wie 28 mg/(kgKG-d) reines Theobromin.

Aus den o.a. beiden subakuten Untersuchungen von Wang und Co-Autoren errechnen sich die folgenden **LOAEL bzw. NOAEL** für die beobachteten Wirkungen an den Testes:

LOAEL: 500 mg/(kgKG-d) Theobromin rein über 7 Tage

LOAEL: 250 mg/(kgKG-d) Theobromin rein über 31 Tage

LOAEL: 250 mg/(kgKG-d) Theobromin in Kakao-Extrakt über 31 Tage

NOAEL: 500 mg/(kgKG-d) Theobromin in Kakao-Extrakt über 7 Tage

NOAEL: 50 mg/(kgKG-d) Theobromin in Kakao-Extrakt über 31 Tage

Die darüber zu erhaltene **NOAEL** für reines Theobromin anstelle von Theobromin aus Kakao-Extrakt mit 50 mg/kgKG-d berechnet sich unter Beachtung des anderen Serum-Spiegels (Faktor 1,8) zu **28 mg/(kgKG-d) Theobromin rein über 31 Tage (berechnet)**.

Dass Tein (Coffein) in schwarzem Tee in Ratten keine reproduktionstoxischen Wirkungen zeigte, wird auf die Anwesenheit anderer Tee-Inhaltsstoffe wie Catechine oder Flavonole zurückgeführt [Skopiński et al. 2011]. Mäuse und Hamster waren im Hinblick auf Hoden-Atrophie weniger empfindlich bzw. resistent gegen Theobromin [WHO 1991/97; EFSA 2008].

Hunde zeigten bei Kurz- und Langzeit-Applikation von 25-150 mg/(kgKG-d) Theobromin über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr keine Hoden-Atrophie [EFSA 2008; Gans et al. 1980].

4.4.3.2 Wirkungen auf Föten und Neugeborene

Die Aufnahme von Methylxanthinen (Coffein, Theophyllin und Theobromin) kann beim Menschen während der Schwangerschaft und der postnatalen Zeit erheblich stärkere physiologische Wirkungen im Fötus und in den Neugeborenen hervorrufen als bei Erwachsenen. Dies ist bedingt durch einen ungehinderten Transport durch die Plazentaschranke sowie noch nicht ausgereifte enzymatische Aktivitäten und metabolische Vorgänge in Embryos und Kindern, verbunden mit einer längeren Halbwertszeit [Chorostowska-Wynimko et al. 2004].

Nach dem Verzehr von 113 g Schokolade mit 240 mg Theobromin und 16 mg Coffein wurden in Blutplasma, Speichel und Muttermilch nach 2-3 Stunden Theobromin-Konzentrationen von 3,7 bis 8,2 mg/L gemessen (in der Muttermilch 3,7-7,5 mg/L, Mittelwert 5,3 mg/L). Das Konzentrationsverhältnis Milch/Plasma betrug 0,82, das Verhältnis Speichel/Plasma 0,92 [Resman et al. 1977]. Die aus der Aufnahme von Muttermilch resultierende Theobromin-Exposition Neugeborener wurde zu **1-2 mg/(kgKG-d)** berechnet; eine solche Dosis war in den meisten Neugeborenen **bereits pharmakologisch aktiv** (stimulierende Wirkung auf das

¹⁰ Sertoli-Zellen: spezielle, teilungsunfähige Zellen des Hodengewebes, die die Hodenkanälchen gegenüber den Blutgefäßen abschirmen

Nervensystem, die Harnausscheidung und den Herzmuskel sowie Entspannung der glatten Muskulatur der Bronchien [EFSA 2008]. Zudem war die Eliminations-Halbwertszeit bei einer Einmal-Dosis von 25 mg/kg KG in trächtigen Ratten signifikant erhöht (nicht bei niedriger Dosis von 5 mg/kg KG) [Abdi et al. 1993]. Damit erhöht sich die Exposition des Fötus und gestillter Neugeborener nach der Aufnahme von Theobromin (Schokolade, Kakao) oder Coffein (Kaffee, Tee) zusätzlich. Das Neugeborene einer Mutter mit regelmäßigem Mate-Genuss während der Schwangerschaft zeigte bis 84 Stunden nach der Geburt Entzugserscheinungen; in verschiedenen biologischen Matrices von Mutter und Kind wurden hohe Konzentrationen von Coffein und Theobromin gemessen [Martín et al. 2007].

In den Föten schwangerer Frauen (n=100) wurde nach Genuss von einmalig 30 g Schokolade mit 30 % oder 80 % Kakao (Theobromin geschätzt 1,3-3,9 bzw. 3,4-10,3 mg/kg KG¹¹) eine signifikante dosisabhängige Erhöhung der Herzakzelerationen festgestellt: Die mittlere Zahl stieg bei der niedrigen Dosierung von 4,2 auf 6,0, bei der hohen Dosis von 4,3 auf 8,9. Nur bei der hohen Dosierung wurden des Weiteren festgestellt [Buscicchio et al. 2013]:

- eine Erhöhung der Zahl fetaler Bewegungen (von 24 auf 52),
- eine Verlängerung der Episoden hoher Herzratenvarianz (von ca. 8 auf 13 min),
- eine Verlängerung der Kurzzeitvarianzen (von 7,4 auf 12,7 ms).

Diese Ergebnisse belegen eine Veränderung der Herzaktivität im Fötus bei einer einmaligen Exposition von wenigen mg/kg KG Theobromin.

Die Wirkung von Theobromin auf die Milchmenge und -zusammensetzung in säugenden Ratten sowie auf das Wachstum der Nachkommen wurde von Hart und Grimble (1990) untersucht. Die Applikation erfolgte während der Trächtigkeit und in den ersten beiden Wochen des Säugens. Bei **2 mg/(kgKG-d)** erhöhte Theobromin (ebenso wie die 25-fache Dosis an Coffein) das Gewicht der Nachkommen (am 13. Tag) signifikant; die Korrelation mit Milchmenge und -zusammensetzung war nur schwach (nicht signifikant) ausgeprägt.

Eine einmalige Injektion von 500 oder 600 mg/kg KG Theobromin an weiblichen Mäusen am 12. Tag der Trächtigkeit ergab neben maternaler Letalität (bei der höheren Dosis) bei beiden Dosen verringertes Gewicht der Föten, Missbildungen und subkutane Hämatome [Fujii und Nishimura 1969; WHO 1991/97].

Von Tarka et al. wurden weiblichen Ratten an den Trächtigkeitstagen 6-19 täglich 0,675 g/kg oder 1,35 g/kg Theobromin im Futter appliziert (53 bzw. 99 mg/kg KG). Es wurde keine maternale Toxizität beobachtet, in der höheren Dosis jedoch eine Abnahme der Fötus-Gewichte und eine signifikante Erhöhung der Häufigkeit von Skelettveränderungen (verzögerte Knochenbildung des Brustbeins) [Tarka et al. 1986a; IARC 1991/97]. **Aus dieser Studie ergibt sich ein NOAEL für Skelettveränderungen in den Nachkommen von 53 mg/(kgKG-d).**

Die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und die Kontrolle ausufernder Blutgefäßbildung (Anti-Angiogenese) spielen eine Schlüsselrolle in vielen physiologischen und pathologischen Befunden; antiangiogenetisch wirkende Arzneimittel können in schwangeren Frauen schwere Entwicklungsstörungen der Nachkommen verursachen¹² [Barcz et al. 2007]. Zur Prüfung der Wirkung von Theobromin auf die Angiogenese wurden von Chorostowska-Wynimko et al. (2004) 2 Monate alten Mäusen während Trächtigkeit und Säugen täglich 2 oder 6 mg Theobromin appliziert: Dies entspräche 100 bzw. 300 mg/(kgKG-d)¹³. Beobachtet wurden bei der höheren Dosis eine signifikante Hemmung des embryonalen Wachstums (Körpergewicht und angiogene Gewebeaktivität), ebenso signifikant kürzere Gliedmaßen in der postnatalen Phase (nach 4 Wochen). Nach 6 Wochen zeigten sich zudem in beiden Dosisgruppen beachtliche Veränderungen der Funktionalität des Immunsystems [Chorostowska-Wynimko et al. 2004, Smit 2011].

¹¹ Berechnet mit 1-3 % Theobromin in Kakaopulver und einem mittleren weiblichen Körpergewicht von 70 kg

¹² Zu den antiangiogenetisch wirkenden Arzneimitteln gehört auch das schwere Missbildungen verursachende Thalidomid.

¹³ errechnet mit einem Gewicht von 20 g/Maus

Die teratogenen Wirkungen hatte auch Schokolade; diese wurden aber auf den Gehalt an Epigallocatechin¹⁴ zurückgeführt [Skopiński et al. 2003, Smit 2011]. Skopiński et al. (2003) und Chorostowska-Wynimko et al. (2004) empfehlen eine Verringerung der Theobromin-Aufnahme (und abgeleitet auch anderer Methylxanthine wie Coffein) während der Schwangerschaft.

Aus den signifikanten Veränderungen der Immunsystem-Parameter der Nachkommen von Mäusen errechnet sich ein Lowest observed adverse effect level (LOAEL) für die Reproduktionstoxizität von 100 mg/(kgKG-d).

Eine 3-Generationen-Studie mit männlichen und weiblichen Ratten ergab bei Applikation von Kakao-Pulver mit dem Futter über 12 Wochen in der 0. Generation keine adverse Wirkung auf die Reproduktion (Theobromin+Coffein-Dosen Männchen/Weibchen 30/36, 72/86 oder 104/126 mg/(kgKG-d)). In den beiden höchsten Dosierungen wurde in allen drei untersuchten Generationen nicht-reproduktive Toxizität beobachtet. Von den Autoren wird festgestellt, dass bis 5 % Kakao-Pulver im Futter keine reproduktionstoxischen Wirkungen zu verzeichnen waren, abgesehen von einem nicht-signifikanten Auftreten von Hoden-Atrophien. Der **NOAEL für reproduktionstoxische Wirkungen an männlichen und weiblichen Ratten** leitet sich aus diesem Versuch mit **104 bzw. 126 mg/(kgKG-d) Methylxanthine** (Theobromin+Coffein) ab [Hostetler et al. 1990; WHO 1991/97].

Eine Studie im Rahmen des U.S. National Toxicology Programme (NTP) galt der reproduktionstoxischen Wirkung von Theobromin auf Mäuse. Appliziert wurden 1, 2,5 oder 5 mg Theobromin je kg Futter entsprechend 126, 335 und 630 mg/(kgKG-d) über 18 Wochen. In allen Dosierungen war die Zahl lebender Nachkommen je Wurf reduziert, bei der höchsten Dosis auch die Zahl der Würfe je Paar. Die Zahl der Lebendgeburten war durch Theobromin reduziert, ebenso das Gewicht der Nachkommen. Der **LOAEL** ergibt sich aus dieser Studie zu **126 mg/(kgKG-d)**. Die höchste Dosis bewirkte zudem erhöhte Lebergewichte und reduzierte Gehirngewichte in männlichen und weiblichen Tieren. Bei den männlichen Mäusen waren die Hodengewichte reduziert und die Zahl abnormaler Spermien erhöht. Es gab keine morphologischen Veränderungen der Reproduktionsorgane und der Hormonmuster bei Männchen und Weibchen. Die Reproduktionstoxizität in den Nachkommen wurde nicht untersucht [Lamb et al. 1997; EFSA 2008].

Bei Applikation an weiblichen Kaninchen am 6. bis 29. Tag der Trächtigkeit von täglich 0,625, 1,25 oder 1,88 g/kg Theobromin im Futter entsprechend 21, 41 oder 63 mg/(kgKG-d) wurden Anorexie (Magersucht), Diarrhoe (Durchfall), weicher Stuhl und Vaginalausflüsse in allen Gruppen beobachtet, zudem verringerte Fötengewichte und Missbildungen der Nachkommen (unvollständige Knochenbildung oder fehlende Gliedmaßen (Brustbein, Mittelzehe oder Zehenglieder)). Die Brustbein-Veränderungen waren bei 41 und 63 mg/(kgKG-d) signifikant [Tarka et al. 1986b]. Als **No-observed adverse effect level (NOAEL) für Skelettveränderungen in Kaninchen** ergibt sich aus dieser Studie für **Theobromin** eine Körperdosis von **21 mg/(kgKG-d)** [EFSA 2008].

Die Applikation von Kakaopulver an weiblichen Kaninchen am 6. bis 29. Tag der Trächtigkeit mit täglich 25, 50 oder 75 g/kg Methylxanthinen (überwiegend Theobromin) im Futter entsprechend 25, 50 oder 75 mg/(kgKG-d) Methylxanthine ergab neben Magersucht signifikant höhere Missbildungen am Brustbein in der Gruppe mit der höchsten Dosierung und Missbildungen der mittleren Knochen in der mittleren und höchsten Dosierung [Tarka et al. 1986b].

Etwa mit gleicher Dosis wie bei Theobromin bewirkte auch **Coffein** in Mäusen und Ratten teratogene Wirkungen, ebenfalls unter anderem an Gliedmaßen und Fingern: Die Missbildungen traten an Mäusen bei 50-75 mg/(kgKG · d) auf, an Ratten bei 80 mg/(kgKG-d). Bei Dosierung über den Tag verteilt lag die in Ratten wirksame Dosis bei 330 mg/(kgKG-d) [Nahlig und Detry 1994]. Eine andere Übersichtsarbeit nennt für **Entwicklungsstörungen an Nagetieren** durch Coffein einen **NOEL von 30 mg/(kgKG-d)**, für reproduktionstoxische Wirkungen 80-120 mg/(kgKG-d), für teratogene Wirkungen 8100 mg/(kgKG · d)

¹⁴ Epigallocatechin-gallat ist u.a. Hauptbestandteil von grünem Tee; es hemmt die Angiogenese

[Christian und Brent 2001]. Die Angabe von **2 mg/(kgKG-d)** für sehr schwache teratogene Wirkungen von Bützer (2003) ist nicht mit einem Literaturzitat belegt, und kann daher hier nicht verwendet werden.

Die Nachkommen von Ratten, die vom 4. Tag der Trächtigkeit bis zur Geburt **10 mg/(kgKG-d) Coffein** mit dem Trinkwasser erhalten hatten, zeigten deutliche kognitive Störungen (des Erinnerungsvermögens) [Soellner et al. 2009].

4.4.4 Mutagenität

Theobromin erwies sich als nicht mutagen im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* TA97A, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537 und TA1538 mit und ohne metabolische/r Aktivierung [Brambilla et al. 2013; CCRIS 2013]. Giri et al. (1999) beobachteten eine sehr schwache mutagene Wirkung von Theobromin (und Theophyllin) mit TA 102 und TA 104 nach metabolischer Aktivierung mit S9, nicht aber mit anderen Strängen mit oder ohne Aktivierung. Im Test mit *Escherichia coli* war Theobromin dagegen mutagen [Brambilla et al. 2013; WHO 1991/97]. Ebenso induzierte es Mutationen in niederen Eukaryonten (*Euglena gracilis*) [WHO 1991/97].

Von Woziwodzka et al. (2011) wurde belegt, dass alle von ihnen untersuchten Methylxanthine (Coffein, Theophyllin und Pentoxifyllin) die mutagene Wirkung Krebs erzeugender heterocyclischer aromatischer Amine hemmen.

In Pflanzen (Ackerbohne, *Vicia faba*) induzierte Theobromin keine Chromosomenaberrationen, ebensowenig in der Schwarzbäuchigen Taufliede (*Drosophila melanogaster*) [WHO 1991/97].

In Maus-Lymphomzellen bewirkte Theobromin eine höhere Frequenz von Mutanten bei extrem zytotoxischen Dosen [Brambilla et al. 2013; CCRIS 2013; WHO 1991/97].

In Ovarzellen des Chinesischen Hamsters erhöhte Theobromin die Schwester-Chromatid-Austauschrate signifikant, jedoch nur in Abwesenheit einer metabolischen Aktivierung [Brambilla et al. 2013; IARC 1991], Chromosomenaberrationen wurden nicht induziert [WHO 1991/97].

In Kulturen von Human-Lymphozyten erhöhte Theobromin die Schwester-Chromatid-Austauschrate bei höheren Dosen in Abwesenheit einer metabolischen Aktivierung [Brambilla et al. 2013; IARC 1991]. Diese Wirkung wird eher auf eine indirekte Wirkung als auf eine direkte Schädigung der DNA zurückgeführt [IARC 1991]. Theobromin induziert jedoch auch Chromosomenbrüche in Human-Lymphozyten, anders als in Mäusezellen [WHO 1991/97].

In vivo induziert Theobromin in Knochenmark des Chinesischen Hamsters Schwester-Chromatid-Austausch und Mikrokerne, jedoch keine Chromosomenaberrationen [Brambilla et al. 2013; WHO 1991/97]. Auch in Knochenmarkzellen von Mäusen induzierte Theobromin (wie auch Theophyllin) *in vivo* signifikante Schwester-Chromatid-Austausche [Giri et al. 1999].

Weder in Mäusen noch in Ratten wurde ein Dominant-Letal-Effekt beobachtet [Brambilla et al. 2013; WHO 1991/97].

Die Bindung von Theobromin, Coffein und Theophyllin an gefriergetrocknete DNA von Kalbs-Thymus wurde von Johnson et al. (2012) auch mittels UV-Absorption und Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) nachgewiesen. Franco et al. (2013) messen dieser Wechselwirkung mit DNA aber keine Bedeutung für die menschliche Gesundheit bei.

4.4.5 Krebs erzeugende, Krebs fördernde oder Krebs hemmende Wirkung

4.4.5.1 Ergebnisse von Langzeitstudien an Labortieren

Die Reaktion von primären, sekundären und tertiären Aminen mit Nitrit kann bekanntlich zur Bildung von Nitrosaminen führen, von denen einige als Krebs erzeugend für den Menschen anzusehen sind (Kategorie 2 [DGF 2013]). Vor diesem Hintergrund wurde auch Theobromin auf Krebs erzeugende Wirkung geprüft; es hat sowohl eine sekundäre als auch eine tertiäre aliphatische Aminfunktion wie die bekannten Karzinogene (Liste s. DFG 2013). Die Applikation an männlichen Ratten über 64 Wochen in einer Dosis von 0,5 % Theobromin im Futter (ca. 250 mg/(kgKG·d)) – mit/und/oder/ohne Nitrit – über 64 Wochen (zu Beginn 1,0 % über 3 Wochen) ergab keine Hinweise auf neoplastische oder prä-neoplastische Wirkungen (böartige Geschwulste bzw. Vorläuferstadien) [Friedman et al. 1978]. Die gravierenden Schäden an den Hoden werden im Abschnitt 3.4.3.1 beschrieben.

Das chemisch verwandte Coffein verursachte in Ratten während 2-jähriger Applikation ebenso wie Theobromin keine Tumorbildung [Tarka 1982].

Langzeituntersuchungen mit Theophyllin an männlichen und weiblichen Ratten mit 7,5, 25 oder 75 mg/(kgKG·d) (Schlundsonde) ergaben ebenfalls keine Hinweise auf ein Krebs erzeugendes Potenzial [NTP 1998; Brambilla et al. 2012].

Auch Langzeituntersuchungen mit dem chemisch eng verwandten Theophyllin an männlichen und weiblichen Mäusen mit 15, 50 oder 150 mg/(kgKG · d) bzw. 7,5, 25 oder 75 mg/(kgKG·d) (Schlundsonde) ergaben keine Hinweise auf ein Krebs erzeugendes Potenzial [NTP 1998; Brambilla et al. 2012]. Die Langzeitstudien zu Theophyllin zeigten sogar eine Abnahme der Brustkrebs-Häufigkeit in weiblichen Ratten (in Folge geringerer Körpergewichte) und der Leber-Adenome und -Karzinome in männlichen und weiblichen Mäusen [NTP 1998].

Eine Krebs hemmende Wirkung von Theobromin wurde auch an weiblichen Mäusen nach einmaliger subkutaner Injektion von Ethylcarbamat (Urethan) getestet: Eine siebenfache subkutane Injektion von insgesamt 63 mg/kg KG Theobromin ergab nach 5 Monaten eine signifikante Verringerung der Zahl an Lungenkrebs erkrankter Mäuse und der Tumor-Zahl je Lunge [WHO 1991/97; CCRIS 2013].

4.4.5.2 Epidemiologische Studien

Eine epidemiologische Studie erbrachte ein erhöhtes Prostatakrebsrisiko bei älteren Männern, die täglich 11-20 mg bzw. >20 mg Theobromin aufgenommen hatten (n=41 bzw. 51, Kontrolle n=96 bzw. 105). Zigarettenrauchen, Alkohol, Kaffee- oder Teegenuss und Coffein waren nicht mit Prostatakrebsrisiko korreliert [EFSA 2008 Slattery und West 1993]. Die Autoren verweisen in diesem Zusammenhang u.a. darauf, dass Theobromin gentoxisch ist (s. Abschnitt 3.4.4); es verursache mehr Schwester-Chromatid-Austausche als Coffein, zudem besitze Coffein einen Schwellenwert für diese Wirkung. Auf Hoden-Atrophie und Anomalien spermabildender Zellen wird ebenfalls verwiesen [Slattery und West 1993].

Mit überraschend guten Korrelationskoeffizienten (0,86 bzw.0,76) wird das weltweit kontinuierlich anwachsende Auftreten von Hodenkrebs und Hypospadie (Fehlbildung des Penis¹⁵) bei 20- bis 34-jährigen Männern (Kollektive 1998-2002 bzw. 1999-2003) mit einem steigenden Kakaokonsum in den Geburtsjahren 1965-1980 in Verbindung gebracht. Als Ursache werden die in einigen Tierversuchen erwiesenen reproduktionstoxischen und chromosomenschädigenden Wirkungen von Theobromin in Verbindung mit der

¹⁵ Harnröhrenöffnung befindet sich an der Unterseite des Penis

Plazentagängigkeit dieser Substanz und einem verzögerten Metabolismus in Neugeborenen angeführt¹⁶ [Giannandrea 2009].

4.4.5.3 Hemmung des Wachstums von Tumoren

Beim Wachstum von Eierstockkrebs und der Metastasenbildung spielt das Wachstum von Blutgefäßen (Tumor-Angiogenese¹⁷) eine wichtige Rolle. Die Neubildung von Gefäßstrukturen durch zirkulierende Stammzellen (Angioblasten), die sich zu de-novo-Endothelzellen ausbilden, (Vaskulogenese) wird unter anderem durch Adenosin stark stimuliert. Barcz et al. (1998) stellten fest, dass der Adenosin-Hemmer Theobromin auch eine signifikante Hemmung der angiogenen Aktivität von Human-Eierstock-Krebszellen bewirkt. Die Adenosin-hemmende Wirkung von Theobromin (und auch Coffein) bewirkt nach Smit (2011) ursächlich die Antitumor-Wirkung dieser Methylxanthine, weil in den Karzinomen Adenosinrezeptoren das Krebs-Wachstum fördern.

Eine andere, möglicherweise zur Krebsbekämpfung nutzbare Wirkung von Theobromin liegt darin, dass Methylxanthine die Wirkung alkylierender Agenzien in der Chemotherapie verstärken. Krebszellen unterscheiden sich von normalen Körperzellen: Sie teilen sich häufiger, haben einen lebhafteren Stoffwechsel und wachsen schneller. Deshalb sind sie auch anfälliger gegen auftretende DNA-Schäden. Diese Eigenschaft macht man sich in der Chemotherapie durch den Einsatz zellschädigender Medikamente (Zytostatika) zu Nutze, die Krebszellen stärker schädigen als normale Zellen. Theobromin kann die Reparaturmechanismen in den Krebszellen hemmen und so synergistisch die Schädigung der Krebszellen durch alkylierende Agenzien verstärken. Dazu ist zum einen eine schwach zytotoxische (zell- und gewebeschädigende) Wirkung der Methylxanthine nötig, zum anderen ein ausreichend langer Verbleib zur Verhinderung der Zellreparatur. *In vitro* wurde die Theobromin-induzierte Verstärkung der Krebszellen-Schädigung (Zell-Sensibilisierung; HeLa- und HT29-Zelllinien) in Folge einer Exposition gegenüber den wasserlöslichen Zytostatika Peroxycyclophosphamid und Phosphoramid-Mustard (Chlorethylphosphorsäureamid) von Byfield et al. (1981) getestet. Erforderlich war eine Theobromin-Konzentration von ca. 200 µg/ml bei einer Expositionsdauer von 12-24 Stunden.

Mögliche Mechanismen zur Erklärung der pro- und antikarzinogenen Wirkungen von Theobromin und Coffein werden von Smit (2011) diskutiert. Ebenso wird vom Autor auf die möglichen Wirkungen anderer Nahrungsinhaltsstoffe hingewiesen, welche die Übertragung von Tierversuchen mit Theobromin auf den Menschen erschweren.

4.5 Ableitung eines Geringfügigkeitsschwellenwertes GFS_{human} für Theobromin

Wie aus der Tabelle 1 und den vorangegangenen Abschnitten ersichtlich ist, wurden die niedrigsten NOAEL für eine reproduktionstoxische Wirkung von Theobromin in Tierversuchen zwischen 2 und 20 mg/(kgKG·d) ermittelt. Bei 2 mg/(kgKG·d) Theobromin im Trinkwasser wurde eine Gewichtszunahme gesäugter Ratten beobachtet¹⁸.

¹⁶ Als mögliche andere Erklärung der festgestellten Korrelationen verweist der Autor auf eine mögliche Störung des Gleichgewichts von freien und gebundenen Hormonen mit damit verbundener Erhöhung des Estradiolspiegels der schwangeren Mütter als Folge eines erhöhten Konsums „energiedichter“ Lebensmittel. Der Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Süßigkeiten und dem Estradiolspiegel wird u.a. von Fung et al. (2007) beschrieben. Ein erhöhter Estrogenspiegel im Uterus kann nach Sharpe und Skakkebaek (2006) zu den beschriebenen Folgen in den Geschlechtsorganen der männlichen Nachkommen führen. Eine Korrelation des weiblichen Estradiolspiegels mit dem Verzehr von Süßigkeiten wird von Fung et al. (2007) beschrieben.

¹⁷ Angiogenese: Wachstum von Blutgefäßen durch Sprossungs- oder Spaltungsvorgänge aus bereits vorgebildeten Blutgefäßen.

¹⁸ Die bei 2 mg/(kg KG · d) beobachtete signifikante Gewichtszunahme der Nachkommen wird hier nicht als adverse Wirkung interpretiert, weil die übrigen erfassten Parameter durch Theobromin nicht beeinflusst wurden.

In Säuglingen bewirkte nach Schokoladenverzehr der Mutter eine errechnete Theobromin-Dosis von 1-2 mg/(kgKG-d) über die Muttermilch eine Stimulation des Nervensystems, der Harnausscheidung und des Herzmuskels sowie eine Entspannung der glatten Bronchien-Muskulatur.

Eine Krebs erzeugende Wirkung von Theobromin kann nicht ausgeschlossen werden; zwar fehlen angemessene Langzeitstudien an Labortieren für diese Substanz, es gibt jedoch Hinweise auf Prostata- bzw. Hodenkrebs aus zwei epidemiologischen Auswertungen und Hinweise auf eine mutagene Wirkung (Schwester-Chromatid-Austausch und Chromosomenbrüche). Für das chemisch eng verwandte Theophyllin gibt es dagegen Langzeitstudien an Ratten und Mäusen mit negativem Ergebnis.

Aus dem **NOAEL von 2 mg/(kgKG-d)** für reproduktionstoxische Wirkungen von Theobromin an Ratten (s. Abschnitt 3.4.3.2) und einem Extrapolationsfaktor von 100 (10 für die Übertragung vom Tierversuch auf den Menschen und 10 zur Berücksichtigung empfindlicher Personengruppen) ergibt sich daraus eine vorläufige tolerable Dosis von 20 µg/(kgKG-d).

Umgerechnet auf eine 70 kg schwere Person und eine Trinkwasseraufnahme von 2 L/d entspricht dies einer tolerablen Trinkwasserkonzentration von 700 µg/L. Die Aufnahme von Theobromin mit Nahrungs- und Genussmitteln ist wahrscheinlich; der „unfreiwillige“ Expositionsbeitrag über das Trinkwasser sollte nicht mehr als 10 Prozent betragen. Daraus resultiert ein GFS-Vorschlag von $GFS_{human} (vorläufig) = 70 \mu\text{g/L}$.

Ein ähnlicher Wert ergibt sich aus der beobachteten unerwünschten stimulierenden Wirkung auf Säuglinge (**LOAEL) von 1-2 mg/(kgKG-d)** (s. Abschnitt 3.4.3.2). Hier ist ein Extrapolationsfaktor von 10 anzusetzen für die Übertragung vom beobachteten LOAEL auf einen NOAEL; für den niedrigeren Wert entspricht dies einer vorläufigen tolerablen Dosis von 100 µg/(kgKG-d). Die Trinkwasseraufnahme für einen 4 kg schweren Säugling wird mit täglich 1 Liter angenommen [UBA 2003] entsprechend einer tolerablen Dosis für Säuglinge von 400 µg/d. Bei einem 10-prozentigen Expositionsbeitrag ergibt sich daraus ein vorläufiger GFS_{human} von

$$GFS_{human} (vorläufig) = 40 \mu\text{g/L}.$$

Diese Geringfügigkeitsschwelle liegt damit unterhalb der mittleren Aufnahmemenge über Nahrung in den USA von ca. 560 µg/(kgKG-d) bzw. wird bereits überschritten mit der Aufnahme einer 100-g-Tafel schwarzer Schokolade.

4.6 Zusammenstellung ökotoxikologischer Daten für Theobromin, Coffein und Theophyllin

Die Datenbasis für Theobromin ist gering. Wenn zu einer Substanz Daten fehlen, können unter bestimmten Bedingungen die Eigenschaften eng verwandter chemischer Analoga herangezogen werden (sog. „Read across“) [TGD 2011, S. 25ff. und 115]. Die folgenden Bedingungen müssen für diesen Fall bei der Betrachtung von Toxizitäten erfüllt sein:

Allerdings sind nach den TGD 2011 analoge Daten nicht geeignet für die Vorhersage der Toxizität der sensibelsten Spezies. Auch müssen die Eigenschaften und der Wirkmechanismus der zu vergleichenden Substanzen ähnlich sein¹⁹.

In Säugern und dem Menschen konnte eine solche enge Verwandtschaft für Theobromin, Coffein und Theophyllin gezeigt werden (s. Kapitel 3.3 und 3.4). Im Folgenden sind deshalb die Ökotoxizitäts-Daten für alle drei Methylxanthine aufgeführt.

Erst danach wird entschieden, welche der Daten zur Ableitung eines GFS-Wertes für Theobromin herangezogen werden können. Grau unterlegte Studien sind dazu geeignet.

4.6.1 Fische

Kurzzeittests Fische

Zebrabärbling (*Danio rerio*):

Theobromin: LC₅₀ (48 h) = 145 mg/L [GSBL a 2014]

Theobromin: LC₅₀ (48 h, stat.; Embryos) = 568 mg/L [Ali et al. 2012]

Theobromin: LC₅₀ (72 h, stat.; Embryos) = 420 mg/L [Ali et al. 2012]

Theobromin: LC₅₀ (96 h) = 136 mg/L [GSBL a 2014]

Theobromin: LC₅₀ (96 h, stat.; Embryos) = 150 mg/L [Ali et al. 2011, 2012]

Theobromin: NOEC (4 min; Larven, Hemmung der visuomotorischen Aktivität) = 10 mg/L [Ali et al. 2012]

Theobromin: LOEC (4 min; Larven, Hemmung der visuomotorischen Aktivität) = 30 mg/L [Ali et al. 2012]

Coffein: LC₅₀ (24 h, stat.; Embryos/Larven) = 735 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b, Selderslaghs et al. 2012];

Coffein: EC₅₀ (48 h, stat.; abnormale Entwicklung der Embryos/Larven) = 303 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b, Selderslaghs et al. 2012];

Coffein: LC₅₀ (48 h, stat.; Embryos/Larven) = 691 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b, Selderslaghs et al. 2012];

Coffein: LC₅ (24 h; Embryos) = 200 mg/L (nominal) [Chen et al. 2008];

Coffein: LC₆₁ (24 h; Embryos) = 250 mg/L (nominal) [Chen et al. 2008];

Coffein: LC₇₈ (24 h; Embryos) = 275 mg/L (nominal) [Chen et al. 2008];

Coffein: LC₁₀₀ (24 h; Embryos) = 300 mg/L (nominal) [Chen et al. 2008];

Coffein: NOEC (24 h; Embryos: Körperlänge) = 150 mg/L (nominal) [Chen et al. 2008];

Coffein: NOEC (48 h; Embryos: Körperlänge) = 35 mg/L (nominal) [Chen et al. 2008];

Coffein: LOEC (48 h; Embryos: reduzierte Körperlänge) = 150 mg/L (nominal) [Chen et al. 2008];

¹⁹ „Predictive and analogue methods may be used for generating supporting data but are not suitable for predicting toxicity to be used as critical data. Furthermore, the range of substances to which these models can be applied is limited to chemicals with certain physicochemical and mode of action properties and are not suitable for all substances.“[TGD 2011, S. 26].

Coffein: LOEC (48 h; Embryos/Larven: Berührungsempfindlichkeit, Ausrichtung der Muskelfasern) = 17,5 mg/L (dosisabhängig stärker bei 35 und 75 mg/L bzw. 150 mg/L) (nominal) [Chen et al. 2008];
 Coffein: LOEC (48 h; Embryos/Larven: Schädigung der Bewegungs-Axone²⁰ und neuromuskulären Verknüpfungen) = 150 mg/L (nominal) [Chen et al. 2008];
 Coffein: EC₅₀ (72 h, stat.; abnormale Entwicklung der Embryos/Larven) = 151 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b, Selderslaghs et al. 2012];
 Coffein: LC₅₀ (72 h, stat. ; Embryos/Larven) = 676 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b, Selderslaghs et al. 2012];
 Coffein: EC (48-96 h, stat.; Embryos: Herzfrequenz, Schlüpfen) = 19,4 mg/L (nominal) [Abdelkader 2012];
 Coffein: LC₅₀ (96 h, stat.) = 87 mg/L (nominal) [OECD 2002]
 Coffein: LC₁₀₀ (96 h, stat.) = 215 mg/L (nominal) [OECD 2002]
 Coffein: EC₅₀ (144 h, stat.; abnormale Entwicklung der Embryos/Larven) = 44,7 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Selderslaghs et al. 2012];
 Coffein: LC₅₀ (144 h, stat.; Embryos/Larven) = 307 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Selderslaghs et al. 2012]
 Coffein: LC₁₀₀ (144 h, stat.; Embryos/Larven) = 1250 mg/L (nominal) [Selderslaghs et al. 2009]
 Coffein: LOEC (72 h, stat.; Embryos/Larven: abnormale Entwicklung der Otholiten²¹, Schlüpfen) = 313 mg/L (nominal) [Selderslaghs et al. 2009]
 Coffein: LOEC (72 h, stat.; Embryos/Larven: abnormale Entwicklung der Augen) = 625 mg/L (nominal) [Selderslaghs et al. 2009]
 Coffein: LOEC (72 h, stat.; Embryos/Larven: abnormale Entwicklung der Körpersegmente, Ablösung des Schwanzes, verlangsamter Herzschlag, Veränderung der Blutzirkulation) = 19,4 mg/L (nominal) [Selderslaghs et al. 2009]
 Coffein: LOEC (72 h, stat.; Embryos/Larven: Knick im Schwanz) = 76 mg/L (nominal) [Selderslaghs et al. 2009]
 Coffein: LOEC (144 h, stat.; Embryos/Larven: Knick im Schwanz, Schwimmverhalten) = 37 mg/L (nominal) [Selderslaghs et al. 2009]
 Coffein: EC₁₀ (60-96 h, stat.; Embryos: Schlüpftrate) = 10 mg/L [Chakraborty et al. 2011];
 Coffein: EC₂₅ (Larven: Herzschlag) = 10 mg/L [Chakraborty et al. 2011];
 Coffein: LOEC (Embryos: sehr geringe Expression des Signalmoleküls Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) = 10 mg/L [Chakraborty et al. 2011];
 Coffein: EC₁₀₀ (Larven: vollständig unterdrückte Expression des Signalmoleküls Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) = 100 mg/L [Chakraborty et al. 2011]
 Coffein: LC₅₀ (48 h, stat. ; Embryos/Larven) = 662 mg/L [Knöbel et al. 2012]
 Coffein: LC₅₀ (48 h, stat. ; Embryos/Larven) = 971 mg/L [Teixidó et al. 2013]
 Coffein: EC₅₀ (48 h, stat. ; Embryos/Larven: Teratogenität) = 155 mg/L [Teixidó et al. 2013]
 Coffein: EC₅₀ (48 h, stat. ; Embryos/Larven: Dottersack-Ödeme, Schwanz- und Kopf-Deformation, verlangsamter Herzschlag, verzögerte Entwicklung) = 183 mg/L [Knöbel et al. 2012]
 Coffein: LOEC (48 h, stat.; Embryos/Larven: morphologische Veränderungen, Missbildungen von Herz, Kopf und Schwanz) = 19,4-97 mg/L (nominal) [Teixidó et al. 2013]
 Coffein: NOEC (48 h, stat.; Embryos/Larven: morphologische Veränderungen, Missbildungen von Herz, Kopf und Schwanz) = 19,4 mg/L (nominal) [Teixidó et al. 2013]
 Coffein: LOEC (48 h, stat.; Embryos/Larven: Acetylcholinesterase-Aktivität) = 290 mg/L (nominal) [Teixidó et al. 2013]
 Coffein: NOEC (48 h, stat.; Embryos/Larven: Acetylcholinesterase-Aktivität, Kopf-Rumpf-Winkel, Schwanzlänge) = 194 mg/L (nominal) [Teixidó et al. 2013]

Dickkopfelritze (Fathead Minnow, *Pimephales promelas*):
 Coffein: LC₅₀ (48 h, stat.) = 100 mg/L [Moore et al. 2008]

²⁰ Axon: schlauchartiger Nervenzellenfortsatz, bildet zusammen mit der Umhüllung die Nervenfasern

²¹ Statolith, Otolith („Ohrstein“): Bestandteil des Gleichgewichtsorgans

Coffein: LC₅₀ (96 h) = 151 mg/L [Cunningham et al. 2006; Rand 2007];
Coffein: LOEC (120 h, semistat.; Wachstum) = 20 mg/L [DeYoung et al. 1996; ECOTOX 2013b];
Coffein: EC₅₀ (120 h, semistat.; Missbildungen von Embryos) = 70 mg/L [ECOTOX 2013b; DeYoung et al. 1996];
Coffein: LC₅₀ (120 h, semistat.) = 720 mg/L (nominal) [DeYoung et al. 1996; OECD 2002; ECOTOX 2013b]
Coffein: LC₅₀ (7 d, semistat.) = 55 mg/L [Moore et al. 2008]
Coffein: EC₅₀ (7 d, semistat.; Wachstum) = 71 mg/L [Moore et al. 2008]

Goldorfe (*Leuciscus idus*):

Coffein: LC₅₀ (96 h, stat.) = 87 mg/L [OECD 2002]

Goldfisch (*Carassius auratus*):

Coffein: NOEC (96 h, semistat.; Erhöhung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität) = 3,2 µg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012];

Coffein: NOEC (96 h, semistat.; Acetylcholinesterase-Hemmung) = 16 µg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012];

Coffein: NOEC (7 d, semistat.; Erhöhung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität) = 3,2 µg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012];

Coffein: NOEC (7 d, semistat.; Acetylcholinesterase-Hemmung) = 16 µg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012]

Coffein: LOEC (1-7 d, semistat.; Anstieg der Aktivität des Enzyms 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD) = 3,2 µg/L (nominal) (ab 400 µg/L **Verringerung** der Aktivität) [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012]

Coffein: LC₀ (7 d, semistat.) = 10 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012]

Guppy (*Poecilia reticulata*):

Coffein: LC₅₀ (96 h) = 280 mg/L [Roth 2013]

japan. Reisfisch (*Oryzias latipes*):

Coffein: NOEC (72-120 h, semistat.; Vitellogenin-Bildung²²) = 2,0 mg/L (nominal) [Kang et al. 2005]

Langzeittests Fische

Zu Theobromin, Coffein oder Theophyllin liegen keine Daten aus chronischen Fischtests vor. Die vorhandenen NOECs müssen aufgrund der angegebenen Testdauern von < 28 d als Kurzzeittests gewertet werden. Die max. Testdauer vorliegender Tests beträgt bei Theobromin bei 96 h bzw 3 d, für Coffein 144 h (6 d) bzw. 168 h (7 d).

4.6.2 Aquatische Invertebraten

Kurzzeittests Invertebraten

Wasserfloh (*Daphnia magna*):

Theobromin: EC₀ (48 h; Schwimmfähigkeit) = 140 mg/L [GSBL a 2014];

Theobromin: EC₅₀ (48 h; Schwimmfähigkeit) = 300 mg/L [GSBL a 2014]

Wasserfloh (*Daphnia magna*):

²² Hormone oder hormonähnliche Stoffe bewirken in Fischen eine erhöhte körpereigene Produktion des Eidotter-Vorläufers Vitellogenin, anomal auch in männlichen Tieren. Diese Vitellogenin-Bildung wird in neueren Tests wie der OECD-Guideline 229 als Endpunkt für estrogene Wirkung bestimmt.

Coffein: EC₅₀ (48 h) = 182 mg/L (nominal) [OECD 2002]

Coffein: EC₁₀₀ (48 h) > 500 mg/L (nominal) [OECD 2002]

Coffein: EC₅₀ (24 h; Immobilisierung) = 160 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Rand 2007; Calleja et al. 1994; Lilius 1995];

Coffein: EC₅₀ (24 h, stat.; Immobilisierung) = 684 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Rand 2007; Lilius 1994, 1995];

Coffein: EC₃₀ (72 h, semistat.; Vitellogenin-Bildung) = 18,2 mg/L [ECOTOX 2013b; Hannas et al. 2011]

Theophyllin: EC₅₀ (24 h, stat.; Immobilisierung) = 155 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013c; Rand 2007; Lilius et al. 1994, 1995];

Theophyllin: EC₅₀ (24 h) = 483 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013c; Rand 2007; Calleja et al. 1994]

Theophyllin: EC₅₀ (24 h) = 474 mg/L (nominal) [Lilius et al. 1995]

Wasserfloh (*Daphnia pulex*):

Theophyllin: EC₅₀ (24 h, stat.; Immobilisierung) = 328 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013c; Lilius et al. 1995]

Wasserfloh (*Daphnia pulex*):

Coffein(hydrat): EC₅₀ (24 h, stat.; Immobilisierung) = 540 mg/L (nominal) [Morrow et al. 2001]

Theophyllin(hydrat): EC₅₀ (24 h, stat.; Immobilisierung) = 277 mg/L (nominal) [Morrow et al. 2001]

Wasserfloh (*Ceriodaphnia dubia*):

Coffein: LC₅₀ (48 h, stat.) = 60 mg/L [Moore et al. 2008]

Kanadische Flussmuschel (*Elliptio complanata*):

Coffein: LOEC (48 h, stat.; Dibenzylfluorescein-Dealkylase) = 15,5 mg/L [Martín-Díaz et al. 2009]

Coffein: LOEC (48 h, stat.; Lipid-Peroxidation, DNA-Schädigung) = 78 mg/L [Martín-Díaz et al. 2009]

Coffein: NOEC (48 h, stat.; 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase, Glutathion-S-transferase, Xanthin-Dehydrogenase) = 1940 mg/L [ECOTOX 2013b; Martín-Díaz et al. 2009]

Salinenkrebs (*Artemia salina*):

Coffein: LC₅₀ (24 h, stat.) = 52,7 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b];

Coffein: LC₅₀ (24 h) = 3460 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Rand 2007; Calleja et al. 1994]

Theophyllin: LC₅₀ (24 h) = 8250 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013c; Rand 2007; Calleja et al. 1994]

Kiemenfüßer (*Streptocephalus proboscideus*):

Coffein: LC₅₀ (24 h) = 410 mg/L (nominal) [Cunningham et al. 2006; Rand 2007; Calleja et al. 1994; ECOTOX 2013b]

Theophyllin: LC₅₀ (24 h) = 425 mg/L (nominal) [Calleja et al. 1994; Rand 2007; ECOTOX 2013c]

Wappen-Rädertier (*Brachionus calyciflorus*):

Coffein: LC₅₀ (24 h) = 4660 mg/L (nominal) [Calleja et al. 1994; Rand 2007; ECOTOX 2013b]

Theophyllin: LC₅₀ (24 h) = 3930 mg/L (nominal) [Calleja et al. 1994; Rand 2007; ECOTOX 2013c]

Gemeiner Süßwasserpolyp (*Hydra vulgaris*):

Coffein: LC₅₀ (96 h, stat.) > 100 mg/L (nominal) [Quinn et al. 2008a; ECOTOX 2013b]

Coffein: NOEC (96 h, stat.; Körperteil-Regeneration) = 100 mg/L (nominal) [Quinn et al. 2008b; ECOTOX 2013b];

Coffein: LOEC (96 h, stat.; vegetative Reproduktion, Embryo) = 100 mg/L (nominal) [Quinn et al. 2008b; ECOTOX 2013b]

Coffein: NOEC (96 h, stat.; Fressverhalten, Anomalien) > 100 mg/L (nominal) [Quinn et al. 2008a; ECOTOX 2013b];

Coffein: LOEC (96 h, stat.; verringertes Haftvermögen) = 25 mg/L (nominal) [Quinn et al. 2008a];

Coffein: LOEC (96 h, stat.; erhöhtes Haftvermögen) = 50 mg/L (nominal) [Quinn et al. 2008a];

Regenwurm (*Lumbricus variegatus*):

Theophyllin: EC₅₅ (15 min, stat.; Anstieg der Pulsrate) = 540 mg/L (nominal) [Crisp et al. 2010; ECOTOX 2013c]

Langzeittests Invertebraten

Wasserfloh (*Ceriodaphnia dubia*):

Coffein: EC₅₀ (7 d, semistat.; Reproduktion) = 44 mg/L [Moore et al. 2008]

Coffein: LC₅₀ (7 d, semistat.) = 46 mg/L [Moore et al. 2008]

Kalifornische Miesmuschel (*Mytilus californianus*):

Coffein: LOEC (30 d, semistat.; **Kiemenlamellen**: zellulärer Stress) = 0,05 µg/L [del Rey et al. 2011]

Coffein: NOEC (30 d, semistat.; **Mantelgewebe**: zellulärer Stress) = 0,5 µg/L [del Rey et al. 2011]

Gemeine Strandkrabbe (*Carcinus maenas*):

Coffein: LOEC (28 d, semistat.; DNA-Schädigung in Kiemen) = 0,1 µg/L, dosisabhängige Korrelation bei 0,1, 5, 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Coffein: LOEC (28 d, semistat.; Zellschädigung: Lipid-Peroxidation in Hepatopankreas, Kiemen und Gonaden) = 5 µg/L, dosisabhängige Korrelation bei 5, 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Coffein: LOEC (28 d, semistat.; DNA-Schädigung in Hepatopankreas und Muskel) = 15 µg/L, dosisabhängige Korrelation bei 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Coffein: NOEC (28 d, semistat.; DNA-Schädigung in Hepatopankreas und Muskel) = 5 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Coffein: LOEC (28 d, semistat.; Anstieg der Aktivität des Enzyms 7-Ethoxyresorufin-O- deethylase, EROD, in Hepatopankreas und Gonaden) = 0,1 µg/L, dosisabhängige Korrelation bei 0,1, 5, 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Coffein: LOEC (28 d, semistat.; Anstieg der Aktivität des Enzyms Dibenzylfluorescein-Dealkylase in Hepatopankreas) = 5 µg/L, dosisabhängige Korrelation bei 5, 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Coffein: LOEC (28 d, semistat.; Erhöhung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität in Hepatopankreas, Kiemen, Muskel und Gonaden) = 5 µg/L, dosisabhängige Korrelation bei 5, 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Coffein: NOEC (28 d, semistat.; Erhöhung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität in Hepatopankreas, Kiemen, Muskel und Gonaden) = 15 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Coffein: LOEC (28 d, semistat.; Erhöhung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität in Hepatopankreas, Kiemen, Muskel und Gonaden) = 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Coffein: LOEC (28 d, semistat.; Verringerung der Lyosommembran-Stabilität als Neutralrot-Retention-Assay in Hepatopankreas) = 15 µg/L (signifikant), dosisabhängige Korrelation bei 0,1, 5, 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013b]

Coffein: EC₅₀ (28 d, semistat.; Verringerung der Lyosommembran-Stabilität als Neutralrot-Retention-Assay in Hepatopankreas) = 19,9 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013b]

4.6.3 Aquatische Pflanzen

Kurzzeittests aquatische Pflanzen

Grünalge (*Desmodesmus subspicatus*):

Coffein: EC₅₀ (72 h, stat.; Biomasse) > 100 mg/L [OECD 2002]

Zerbrechliche Armleuchteralge (*Chara globularis*):

Theobromin: NOEC (24 h, stat.; Verzögerung der Mitose²³, zweikernige Zellen, Chromosomenbrüche) = 500 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Theobromin: LOEC (24 h, stat.; 24 h Verzögerung der Mitose, 25 % zweikernige Zellen, > 20 % Chromosomenbrüche und -brücken) = 750 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Theobromin: LOEC (24 h, stat.; Kerndegeneration) = 1000 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Coffein: NOEC (24 h, stat.; Verzögerung der Mitose, zweikernige Zellen) = 1000 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Coffein: LOEC (24 h, stat.; Verzögerung der Mitose, 5 % zweikernige Zellen) = 1250 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Brauns Armelechteralge (*Chara braunii*):

Theobromin: LOEC (24 h, stat.; 28 h Verzögerung der Mitose, 13 % zweikernige Zellen) = 500 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Theobromin: LOEC (24 h, stat.; Kerndegeneration) = 1000 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Coffein: LOEC (24 h, stat.; Verzögerung der Mitose) = 1000 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Coffein: LOEC (24 h, stat.; Pyknose²⁴) = 10.000 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Armelechteralge (*Nitella furcata*):

Theobromin: LOEC (24 h, stat.; 36 h Verzögerung der Mitose, 13 % zweikernige Zellen) = 500 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Theobromin: LOEC (24 h, stat.; Kerndegeneration) = 1000 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Coffein: NOEC (12 h, stat.; Verzögerung der Mitose) = 1000 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Coffein: LOEC (12 h, stat.; Verzögerung der Mitose) = 1250 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Grünalge (*Sphaeroplea annulina*):

Theobromin: EC (24 h, stat.; Verhalten: Stress) = 300 mg/L [ECOTOX 2013a]

Theobromin: EC₁₀₀ (24 h, stat.; Hemmung der Mitose) = 600 mg/L [Sarma und Chaudhary 1977]

Theobromin: LOEC (24 h, stat.; Verklumpung der Chromosomen) = 300 mg/L [Sarma und Chaudhary 1977]

Grünalge (*Oedogonium acmandrium*):

Coffein: LOEC (Hemmung der Zellteilung) = 1250 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Coffein: LOEC (Zytokinetische Hemmung) = 300 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Cyanobakterien (blaugrüne Algen, *Fischerella muscicola*):

Coffein: EC (div. Wirkungen) = 970 mg/L [Singh und Subbaramaiah 1970]

einzellige Algen (Flagellaten, *Gymnodinium inversum*):

Theobromin: NOEC (24 h, stat.; Hemmung der Zellteilung) = 50 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Theobromin: EC₁₀₀ (24 h, stat.; irreversible Unterdrückung der Zellkernteilung) = 500 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Theobromin: LC (24 h, stat.) = 1000 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

einzellige Algen (Flagellaten, *Gymnodinium inversum*):

Coffein: NOEC (24 h, stat.; Hemmung der Zellteilung) = 500 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Coffein: EC₁₀₀ (24 h, stat.; irreversible Unterdrückung der Zellkernteilung) = 10.000 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Coffein: LC (24 h, stat.) = 10.000 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

²³ Mitose: Zellkernteilung

²⁴ Pyknose: Verdichtung des Chromatins im Zellkern mit Kerndegeneration

Langzeittests aquatische Pflanzen

Grünalge (*Desmodesmus subspicatus*):

Coffein: NOEC (72 h, stat.; Biomasse) = 6,25 mg/L (nominal) [OECD 2002]

Coffein: EC₁₀ (72 h, stat.; Biomasse) = 10,2 mg/L (nominal) [OECD 2002]

Coffein: LOEC (72 h, stat.; Biomasse) = 12,5 mg/L (nominal) [OECD 2002]

Algen in Fluss-Biofilm:

Coffein: LOEC (56 d; Biomasse) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

Bucklige Wasserlinse (*Lemna gibba*):

Coffein: NOEC (7 d, semistat.; Biomasse) = 1000 µg/L (nominal) [Brain et al. 2008; ECOTOX 2013b]

div. marine Algen in Symbiose mit Korallen:

Coffein: NOEC²⁵ (40 d, stat.; Wachstum) = 30 mg/L (nominal) [Pollack et al. 2009]

Cyanobakterien (blaugrüne Algen):

Coffein: NOEC (56 d, fl.; Abnahme der Cyanobakterien in Biofilm) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012; ECOTOX 2013b]

Coffein: LOEC (56 d, fl.; Abnahme der Cyanobakterien in Biofilm) = 10 µg/L [Lawrence et al. 2012]

²⁵ angegeben sind die minimalen Hemmkonzentrationen, = niedrigste Konzentrationen einer Substanz, bei der die Vermehrung der Testorganismen mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden kann

4.6.4 Amphibien

Kurzzeittests Amphibien

Krallenfrosch (*Xenopus laevis*):

Theobromin: LOEC (96 h, stat.; Hemmung des Wachstums) = 60 mg/L [Fort et al. 1998]

Theobromin: LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 75 mg/L (6 von 160 tot, 4 missgebildet [Dawson und Bantle 1987]

Theobromin: LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos: abnormaler Darm, Defekte im Kopf-, Gesichts- und Kieferbereich, Mikrophthalmie²⁶) = 100 mg/L [Fort et al. 1998]

Theobromin: EC₅₀ (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 150 mg/L [Fort et al. 1998]

Theobromin: LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos: Muskelabknickung, Mikroenzephalie²⁷, Bauch-Ödeme) = 200 mg/L [Fort et al. 1998]

Theobromin: LC₅₀ (96 h, stat.; Embryos) = 250 mg/L [Fort et al. 1998]

Theobromin: LOEC (96 h, stat.; Blutung, Skelettabknickung und abnormales Herz) = 350 mg/L [Fort et al. 1998]

Coffein: LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 80 mg/L (0 von 160 tot, 13 missgebildet) [Dawson und Bantle 1987];

Theophyllin: LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 75 mg/L (0 von 160 tot, 12 missgebildet) [Dawson und Bantle 1987]

Coffein: LOEC (48 h; verschiedene Wachstumsstörungen von Larven) = 100 mg/L [Sakamoto et al. 1993];

Coffein: EC₅₀ (96 h; anormales Wachstum) = 68-218 mg/L²⁸ (Laborvergleichstest, n=21), Labormittelwerte 74-158 mg/L (n=7) [Bantle et al. 1994];

Coffein: LC₅₀ (96 h) = 220-370 mg/L²⁹ (Laborvergleichstest, n=21), Labormittelwerte 240-350 mg/L (n=7) [Bantle et al. 1994];

Coffein: LOEC (96 h; Hemmung des Wachstums) = 50-125 mg/L³⁰ (Laborvergleichstest, n=21), Labormittelwerte 50-90 mg/L (n=7) [Bantle et al. 1994];

Coffein: NOEC (96 h, semistat.; Wachstum, Missbildungen von Embryos) > 100 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Richards und Cole 2006]

Coffein: EC₁₀ (96 h, semistat.; Wachstum, Missbildungen von Embryos) > 100 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Richards und Cole 2006];

Coffein: LC₁₀ (96 h, semistat.) > 100 mg/L (nominal) [ECOTOX 2013b; Richards und Cole 2006];

Coffein: EC₅₀ (96 h, semistat.; Wachstum, Missbildungen von Embryos) > 100 mg/L (nominal) [Richards und Cole 2006];

Coffein: LOEC (120 h, semistat.; Wachstum) = 80 mg/L [DeYoung et al. 1996; OECD 2002];

Coffein: EC₅₀ (120 h, semistat.; Missbildungen von Embryos) = 130 mg/L [DeYoung et al. 1996; OECD 2002];

Coffein: LC₅₀ (120 h, semistat.) = 190 mg/L (nominal) [DeYoung et al. 1996; OECD 2002]

Coffein: LOEC (96 h, stat.; Hemmung des Wachstums) = 50 mg/L [Fort et al. 1998]

Coffein: LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos: abnormaler Darm, Defekte im Kopf-, Gesichts- und Kieferbereich, Mikroophthalmie) = 100 mg/L [Fort et al. 1998]

Coffein: LOEC (96 h, stat.; Mikroenzephalie) = 130 mg/L [Fort et al. 1998]

²⁶ Mikrophthalmie: unübliche Kleinheit des Auges

²⁷ Mikroenzephalie: verkleinerter Kopf, verkleinertes Gehirn

²⁸ Die Angaben in ECOTOX (2013b) von 0,068-0,218 µg/L beruhen mutmaßlich auf einer falschen Umrechnung der Originalangaben 0,068-0,218 mg/ml (= 0,068-0,218 g/L). Der gleiche Fehler findet sich auch bei [Fort et al. 1998] in den zusammenfassenden Tabellen 6 und 7.

²⁹ Die Angaben in ECOTOX (2013b) von 0,22-0,37 µg/L beruhen mutmaßlich auf einer falschen Umrechnung der Originalangaben 0,22-0,37 mg/ml (= 0,22-0,37 g/L). Der gleiche Fehler findet sich auch bei [Fort et al. 1998] in den zusammenfassenden Tabellen 6 und 7.

³⁰ Die Angaben in ECOTOX (2013b) von 0,050-0,125 µg/L beruhen mutmaßlich auf einer falschen Umrechnung der Originalangaben 0,050-0,125 mg/ml (= 0,050-0,125 g/L).

Coffein: LOEC (96 h, stat.; Bauch- und Gesichtsödeme, abnormales Maul) = 170 mg/L [Fort et al. 1998]
 Coffein: EC₅₀ (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 120 mg/L [Fort et al. 1998]
 Coffein: LOEC (96 h, stat.; Blutung und Muskelabknickung) = 250 mg/L [Fort et al. 1998]
 Coffein: LOEC (96 h, stat.; Skelettabknickung) = 300 mg/L [Fort et al. 1998]
 Coffein: LC₅₀ (96 h, stat.; Embryos) = 480 mg/L [Fort et al. 1998]
 Theophyllin: EC₅₀ (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 100 mg/L [Fort et al. 1998]
 Theophyllin: LC₅₀ (96 h, stat.; Embryos) = 210 mg/L [Fort et al. 1998]
 Theophyllin: LOEC (96 h, stat.; Hemmung des Wachstums) = 30 mg/L [Fort et al. 1998]
 Theophyllin: LOEC (96 h, stat.; abnormale Defekte im Kopf-, Gesichts- und Kieferbereich) = 90 mg/L [Fort et al. 1998]
 Theophyllin: LOEC (96 h, stat.; Mikroophthalmie, Muskelabknickung, Mikroenzephalie, Bauchödeme) = 120 mg/L [Fort et al. 1998]
 Theophyllin: LOEC (96 h, stat.; Skelettabknickung) = 200 mg/L [Fort et al. 1998]

Langzeittests Amphibien

Leopardfrosch (*Rana pipiens*):

Coffein: LOEC (28 d, semistat.; Kaulquappen: Aktivität) = 0,60 µg/L (vermindert) bzw. 600 µg/L (erhöht) (nominal, signifikant) [Fraker und Smith 2004]
 Coffein: LOEC (28 d, semistat.; Kaulquappen: erhöhte Schreckreaktion) = 0,60 µg/L (nominal, signifikant) [Fraker und Smith 2004]
 Coffein: NOEC (28 d, semistat.; Kaulquappen: Gewicht) = 0,60 µg/L (nominal) [Fraker und Smith 2004; ECOTOX 2013b]
 Coffein: LOEC (28 d, semistat.; Kaulquappen: Gewicht) = 6,0 µg/L (nominal; nicht signifikant) [Fraker und Smith 2004; ECOTOX 2013b]

Amerikanische Erdkröte (*Bufo americanus*):

Coffein: NOEC (14 d, semistat.; Kaulquappen: Mortalität, Aktivität, Gewicht) = 600 µg/L (nominal) [Smith und Burgett 2005; ECOTOX 2013b]

4.6.5 Mikroorganismen

Kurzzeittests Mikroorganismen

Augentierchen (*Euglena gracilis*):

Theobromin bewirkt Mutationen [WHO 1991/97]

Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri*):

Theobromin: EC₁₀ (Lumineszenz, Mortalität) = 250 mg/L [GSBL a 2014]

Coffein: EC₅₀ (5 min) = 672 mg/L [Calleja et al. 1994]

Theophyllin: EC₅₀ (5 min) = 2490 mg/L (nominal) [Calleja et al. 1994]

einzellige Algen (Flagellaten, *Gymnodinium inversum*):

Theobromin: NOEC (24 h, stat.; Hemmung der Zellteilung) = 50 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Theobromin: EC₁₀₀ (24 h, stat.; irreversible Unterdrückung der Zellkernteilung) = 500 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Theobromin: LC (24 h, stat.) = 1000 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Bakterien (*Pseudomonas putida*):

Coffein: EC₁₀ (17 h, stat.; Hemmung der Zellvermehrung) = 1530 mg/L (nominal) [OECD 2002];
Coffein: EC₅₀ (17 h, stat.; Hemmung der Zellvermehrung) = 3490 mg/L (nominal) [OECD 2002];
Coffein: EC₉₀ (17 h, stat.; Hemmung der Zellvermehrung) = 5240 mg/L (nominal) [OECD 2002]

anaerobe Bakterien (*Clostridium perfringens*; wichtigster Erreger des Gasbrandes):

Theophyllin: LOEC (20-44 h; Erhöhung der Zahl hitzeresistenter Sporen um Faktoren 3-1000) = 50 mg/L [Sacks und Thompson 1978]

Coffein: LOEC (Erhöhung der Zahl hitzeresistenter Sporen) = ca. 50 mg/L [Sacks und Thompson 1978]

einzellige Algen (Flagellaten, *Gymnodinium inversum*):

Coffein: NOEC (24 h, stat.; Hemmung der Zellteilung) = 500 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Coffein: EC₁₀₀ (24 h, stat.; irreversible Unterdrückung der Zellkernteilung) = 10.000 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Coffein: LC (24 h, stat.) = 10.000 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Zooplankton: Coffein: EC₅₀ = 600-700 mg/L [Fent et al. 2006]

Schimmelpilz (*Aspergillus tamarii*):

Coffein:

NOEC (Biomasse) = 1000 mg/L [Gutiérrez-Sánchez et al. 2013];

EC (Zunahme der Biomasse) = 2000 mg/L [Gutiérrez-Sánchez et al. 2013];

EC (Abnahme der Biomasse) = 8000 mg/L [Gutiérrez-Sánchez et al. 2013]

Xanthine wirken hemmend auf Viren und Pilze; es gibt Überlegungen zum zukünftigen Einsatz als Virustatika und Antimykotika [Schaarschmidt 2008, S. 107, keine Originalliteratur vorhanden].

Coffein bewirkt Wachstumsreduzierung und Absterben eines Pilzes, der von Blattschneiderameisen in Symbiose kultiviert wird, hat jedoch auf die Ameisen keinen letalen Einfluss [Miyashira et al. 2012].

Langzeittests Mikroorganismen

Mikrometazoen (Nematoden, Rädertierchen): Coffein: NOEC (ca. 49 d, stat.; Zahl der Organismen) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

Fluss-Biofilm: Coffein: LOEC (49 d, stat.; Biomasse, Zusammensetzung der Population) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

Fluss-Biofilm: Coffein:

LOEC (49 d, stat.; verstärktes Wachstum von Bakterien-Biomasse, Dicke, Exopolymer-Produktion, Abnahme der Cyanobakterien-Biomasse und Änderung der Bakterienpopulations-Zusammensetzung) = 10 µg/L [Lawrence et al. 2012]

Bakterien in Fluss-Biofilm:

Coffein: LOEC (56 d, fl.; Biomasse) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

Protozoen-Population in natürlichem Biofilm:

Coffein: EC (ca. 49 d, stat.; Zunahme (!) des Wachstums) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

4.6.6 Terrestrische Pflanzen

Küchenzwiebel (*Allium cepa*):

Theobromin: LOEC (Hemmung der Mitose) = 400 mg/L [Sarma und Chaudhary 1977]

Theobromin: LOEC (Bildung von Zellplatten) = 200 mg/L [Sarma und Chaudhary 1977]

Coffein: LOEC (Hemmung der Zellteilung) = 500 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

4.6.7 Insekten

Zuckmückenlarven:

Coffein: LC₅₀ (48 h, stat.) = 1230 mg/L [Moore et al. 2008]

Hornissen zeigten bei Applikation von Theobromin, Coffein oder Theophyllin erhöhte Nervosität, Ataxie (Störung der Bewegungskoordination), erhöhten Appetit und verringerte Thigmotaxis (Bestreben, sich an berührende Flächen anzuschmiegen und sich zusammen zu schließen). Die Dosis betrug 5-10 µg/Tier entsprechend ca. 8-17 µg/g³¹. Eine Coffein-Dosis von 20 µg/Tier (33 µg/g) war nach einigen Tagen Aufnahme tödlich [Ishay und Paniry 1979]. Eine niedrigere Theobromin-Dosis von 5 µg/Tier (3 µg/g) verlängerte dagegen das Leben von Hornissen [Ishay et al. 1981].

Der natürliche Gehalt von Coffein im Nektar von *Coffea*- und *Citrus*-Pflanzen scheint Bienen nicht zu schaden [Wright et al 2013].

Coffein wirkt als Inhaltsstoff von Pflanzen (insbesondere in ungeschützten Keimlingen) als Insektizid, indem es bestimmte Insekten betäubt oder tötet [Nathanson 1984; Frischknecht et al. 1986]. Eine Applikation von Coffein mit dem Futter tötete die Larven des Tabakswärmers (*Manduca sexta*) bei einer Konzentration, die auch in Teeblättern oder Kaffeebohnen enthalten ist, nämlich 0,68-2,1 Prozent. Wie auch in Säugern (s. Abschnitt 3.3.2.2) wird auch hier als Wirkmechanismus die Erhöhung der Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in Folge einer Methylxanthin-induzierten Hemmung des Enzyms Phosphodiesterase angenommen [Nathanson 1984].

Auch Insektizide des Formamidin-Typs basieren auf einer starken Aktivierung der Synthese von cAMP in Folge einer Hemmung der Phosphodiesterase. Die Kombination von Formamidin-Insektiziden mit Methylxanthinen potenzierte in Folge dessen die Wirkung dieser Insektizide [Nathanson 1984; Bützer 2003].

Andererseits fanden Matsugas et al. (2009) erhebliche Unterschiede der Toxizitäten von Coffein und Theobromin gegenüber der Schwarzbäuchigen Taufliege (*Drosophila melanogaster*).

4.7 Ableitung des Sicherheitsfaktors (SF) bei der Festlegung eines PNEC_{aquat} für Theobromin

Wie die oben aufgeführten ökotoxikologischen Daten zeigen, sind die Daten zu den Methylxanthinen Theobromin, Coffein und Theophyllin sehr ähnlich, soweit vergleichbare Datengruppen vorliegen. Wesentlich wichtiger ist aber die Tatsache, dass die drei Substanzen auf den Menschen, auf Säugetiere, auf Invertebraten, Amphibien und auf Insekten vergleichbare Wirkungen ausüben, beispielsweise durch Hemmung der Phosphodiesterase und damit verbundene Eingriffe in den Stoffwechsel oder hinsichtlich

³¹ Das Gewicht von Hornissen-Arbeiterinnen und Drohnen beträgt 0,5-0,6 g/Tier bzw. 0,6-0,7 g/Tier [Anonym 2013]

eindeutiger reproduktionstoxischer Wirkungen³². Auch sind die von Dawson und Bantle (1987) parallel ermittelten reproduktionstoxischen (teratogenen) Wirkungen der drei genannten Methylxanthine an Embryos von Krallenfröschen im 96-h-Test praktisch identisch. Insofern erscheint es – nur in diesem Ausnahmefall – gerechtfertigt, die ökotoxikologischen Daten zu allen drei Methylxanthinen gleichberechtigt heranzuziehen.

Es wird allerdings dringend empfohlen, die fehlenden experimentellen Daten für Theobromin in Zukunft zu erheben, um eine größere Sicherheit bei der GFS-Ableitung zu erhalten.

Zunächst erfolgt eine Zusammenstellung relevanter zuzüglich weiterer empfindlicher Daten unter den drei trophischen Ebenen. Darüber erfolgt die Ableitung des Sicherheitsfaktors, mithilfe dessen die GFS bezogen auf die empfindlichste Spezies festgelegt wird.

4.7.1 Zusammenstellung des Basisdatensatzes (akute Toxizitäten zu den drei trophischen Ebenen Fische, Wasserflöhe und Algen)

(Die zur weiteren Ableitung herangezogenen Daten sind wiederum grau unterlegt.)

Zusammenstellung akuter Daten

Akute Daten Fische:

Die vorgeschriebene Testdauer für Sicherheitsfaktorrelevante akute Tests an Fischen beträgt 96 h.

Zebrabärbling (*Danio rerio*):

Theobromin: LC ₅₀ (96 h) =	136 mg/L [GSBL a 2014]
Theobromin: LC ₅₀ (96 h, stat.; Embryos) =	150 mg/L [Ali et al. 2011, 2012]
Coffein: LC ₅₀ (96 h, stat.) =	87 mg/L [OECD 2002]
Coffein: EC ₅₀ (144 h, stat.; abnormale Entwicklung der Embryos/Larven) =	44,7 mg/L [ECOTOX 2013b; Selderslaghs et al. 2012]

Dickkopfritze (Fathead Minnow, *Pimephales promelas*):

Coffein: LC ₅₀ (7 d, semistat.) =	55 mg/L [Moore et al. 2008]
Coffein: EC ₅₀ (7 d, semistat.; Wachstum) =	71 mg/L [Moore et al. 2008]

Wegen der Größenordnung der Toxizität sei hier der Kurzzeit-NOEC von 4 Minuten für Theobromin ebenfalls aufgeführt:

Theobromin: NOEC (4 min; Larven, Hemmung der visuomotorischen Aktivität) = 10 mg/L [Ali et al. 2012]

Akute Daten Invertebraten:

Die vorgeschriebene Testdauer für Sicherheitsfaktor-relevante akute Tests an Invertebraten beträgt 48 h.

³² Zur Reproduktionstoxizität von Coffein im Buntbarsch (*Oreochromis niloticus*) und der guten Vergleichbarkeit mit den Wirkungen in Säugern siehe auch [Gómez-Martínez 2011] (Applikation intraperitoneal)

Theobromin:

Wasserfloh (*Daphnia magna*):

EC₅₀ (48 h; Schwimmfähigkeit) = 300 mg/L [GSBLa 2014]

Coffein:

Wasserfloh (*Ceriodaphnia dubia*):

LC₅₀ (48 h, stat.) = 60 mg/L [Moore et al. 2008]

Wasserfloh (*Daphnia magna*):

EC₅₀ (48 h, stat.; Immobilisierung) = 182 mg/L [OECD 2002]

EC₃₀ (72 h, semistat.; Vitellogenin-Bildung) = 18,2 mg/L [ECOTOX 2013b; Hannas et al. 2011]

Salinenkrebs (*Artemia salina*):

Coffein: LC₅₀ (24 h, stat.) = 52,7 mg/L [ECOTOX 2013b]

Kanadische Flussmuschel (*Elliptio complanata*):

Coffein: LOEC (48 h, stat.; Dibenzylfluorescein-Dealkylase) = 15,5 mg/L [Martín-Díaz et al. 2009]

Theophyllin:

EC₅₀ (24 h, stat.; Immobilisierung) =
Lilius et al. 1994, 1995];

155 mg/L [ECOTOX 2013c; Rand 2007;

Akute Daten Algen:

Die vorgeschriebene Testdauer für Sicherheitsfaktor-relevante akute Tests an Algen beträgt 72 h.

Theobromin:

Grünalge (*Sphaeroplea annulina*):

EC (24 h, stat.; Verhalten: Stress) = 300 mg/L [ECOTOX 2013a]

LOEC (24 h, stat.; Verklumpung der Chromosomen) = 300 mg/L [Sarma und Chaudhary 1977]

einzellige Algen (Flagellaten, *Gymnodinium inversum*):

NOEC (24 h, stat.; Hemmung der Zellteilung) = 50 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

EC₁₀₀ (24 h, stat.; irreversible Unterdrückung der Zellkernteilung) = 500 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

LC (24 h, stat.) = 1000 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Coffein:

Grünalge (*Desmodesmus subspicatus*):

EC₁₀ (72 h, stat.; Biomasse) = 10,2 mg/L (nominal) [OECD 2002]

EC₅₀ (72 h, stat.; Biomasse) > 100 mg/L [OECD 2002]

Fazit:

Der Basisdatensatz ist für Theobromin selbst nicht vollständig. Adäquate Daten für den Algentest liegen jedoch für Coffein vor und komplettieren damit den Basisdatensatz.

Empfindlichste Spezies bei den Daten des Basisdatensatzes ist für Theobromin der Zebraabärbling mit 136 mg/L. Andere akute Tests, außerhalb der vorgeschriebenen Versuchsdauer, zeigen empfindlichste Werte mit Theobromin oder Coffein für Flussmuschel, Wasserfloh und Grünalge im Bereich von 10-20 mg/L.

4.7.2 Zusammenstellung chronischer Daten

Chronische Daten Fische:

Allgemein gilt: Ein chronischer NOEC für aquatische Vertebraten zur Verwendung für die Ableitung eines SF sollte eine Testdauer von 28 Tagen haben. Diese Voraussetzung wird von den nachfolgenden Tests nicht erfüllt.

Im Hinblick auf die chronische Toxizität chemischer Substanzen auf aquatische Organismen muss allerdings gerade bei den hier betrachteten Alkaloiden berücksichtigt werden, dass seit Veröffentlichung der TGD 2011 wichtige Prüfrichtlinien herausgegeben wurden, welche über die bisher praktizierten akuten und chronischen Tests hinaus grundlegende Informationen über Wirkungen auf diese Organismen liefern (können), beispielsweise die OECD-Guideline 229 (Fish Short Term Reproduction; 2012), die OECD-Guideline 234 ((Fish Sexual Development Test; 2011) oder die OECD-Guideline 236 (Fish Embryo Acute Toxicity Test; 2013). Mit diesen Kurzzeittests werden Wirkungen auf frühe Entwicklungsstadien festgestellt, die bis dato nur mit den chronischen Tests erfasst wurden, wie nach OECD-Guideline 210 (Fish, Early-life Stage Toxicity Test; 1992, Update 2013). Die Ergebnisse dieser neuen Tests werden im Folgenden als NOEC ebenfalls erfasst und in die GFS-Wert-Ableitung einbezogen.

Ob eine Änderung der hier zu betrachtenden Wirkungsparameter wie Zell- oder DNA-Schäden oder biochemische Parameter für den aquatischen Organismus die gleiche Bedeutung haben kann wie bisher erfasste („klassische“) Parameter, ist unklar.

Im Unterschied zur Humantoxikologie finden biochemische Parameter oder Biomarker in der Ökotoxikologie bisher keine Berücksichtigung bei der Ableitung regulatorischer Werte; als Schutzziel wird die Population, nicht aber das Individuum angesehen. Für statistisch signifikante Wirkungen auf das Überleben, die Entwicklung, das Wachstum oder die Fortpflanzung wird jedoch eine Populationsrelevanz unterstellt [Oehlmann 2014].

Für Theobromin liegen keine chronischen 28d-Tests an Fischen vor.
Lediglich folgende NOEC/LOEC-Angaben liegen vor:

Zebraabärbling (*Danio rerio*)

Theobromin: NOEC (4 min; Larven, Hemmung der visuomotorischen Aktivität) =	10 mg/L	[Ali et al. 2012]
Theobromin: LOEC (4 min; Larven, Hemmung der visuomotorischen Aktivität) =	30 mg/L	[Ali et al. 2012]

Für Coffein wurden u.a. folgende Daten erhalten:

Goldfisch (*Carassius auratus*):

NOEC (96 h, semistat.; Erhöhung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität ³³) =	3,2 µg/L	[ECOTOX 2013b; Li et al. 2012];
NOEC (96 h, semistat.; Acetylcholinesterase-Hemmung ³³) =	16 µg/L	[ECOTOX 2013b; Li et al. 2012];

³³ Bedeutung für die Langzeit-Entwicklung der Fische nicht geklärt

NOEC (7 d, semistat.; Erhöhung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität ³³) =	3,2 µg/L [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012];
NOEC (7 d, semistat.; Acetylcholinesterase-Hemmung ³³) =	16 µg/L [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012]
LOEC (1-7 d, semistat.; Anstieg der Aktivität des Enzyms 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD ³³) =	3,2 µg/L (ab 400 µg/L Verringerung der Aktivität) [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012]
japan. Reisfisch (<i>Oryzias latipes</i>): NOEC (72-120 h, semistat.; Vitellogenin-Bildung) =	2,0 mg/L [Kang et al. 2005]

Damit liegen weder für Theobromin noch für Coffein oder Theophyllin eindeutig chronische SF-relevante Daten für die trophische Ebene der Fische vor. Die höchste Testdauer der vorliegenden Tests liegt bei 7 Tagen mit der empfindlichsten NOEC von 3,2 µg/L für den Goldfisch.

Chronische Daten Invertebraten:

Voraussetzung für das Heranziehen eines chronischen Ökotoxizitätstestes an Invertebraten zur Ableitung eines SF ist eine Testdauer von 21 Tagen (*Ceriodaphnia dubia*: 7 Tage) bei der Ermittlung des NOEC/EC₁₀-Wertes. Solche Daten liegen zu Theobromin nicht vor:

Theobromin:

Wasserfloh (*Daphnia magna*):
EC₀ (48 h; Schwimmfähigkeit) = 140 mg/L [GSBL a 2014];

Coffein:

Wasserfloh (*Ceriodaphnia dubia*):
Coffein: EC₅₀ (7 d, semistat.; Reproduktion) = 44 mg/L [Moore et al. 2008]
Gemeine Strandkrabbe (*Carcinus maenas*):
LOEC (28 d, semistat.; DNA-Schädigung in Kiemen) = 0,1 µg/L, dosisabhängige
Korrelation bei 0,1, 5, 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]
LOEC (28 d, semistat.; Zellschädigung: Lipid-Peroxidation in Hepatopankreas, Kiemen und Gonaden) = 5
µg/L, dosisabhängige Korrelation bei 5, 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]
NOEC (28 d, semistat.; DNA-Schädigung in Hepatopankreas und Muskel) = 5 µg/L [Aguirre-Martínez et
al. 2013a]
LOEC (28 d, semistat.; DNA-Schädigung in Hepatopankreas und Muskel) = 15 µg/L, dosisabhängige
Korrelation bei 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Kalifornische Miesmuschel (*Mytilus californianus*):

Coffein: LOEC (30 d, semistat.; Kiemenlamellen: zellulärer Stress) = 0,05 µg/L [del Rey et al. 2011]
Coffein: NOEC (30 d, semistat.; Mantelgewebe: zellulärer Stress) = 0,5 µg/L [del Rey et al. 2011]

Die trophische Ebene der Invertebraten wird nur eingeschränkt über chronische Tests abgedeckt, weil für Invertebraten adäquate Daten nur zu Coffein vorliegen. Die vorgeschriebenen 21-d-Tests liegen für Theobromin nicht vor, adäquat ist aber der 7d-Reproduktionstest mit dem Wasserfloh *Ceriodaphnia dubia*. Für Tests mit längerer Testdauer von 28-30 d, durchgeführt mit Coffein, wurden niedrigste LOECs im Bereich von 0,05-0,1 µg/L und niedrigste NOECs im Bereich von 0,5-5 µg/l ermittelt.

Chronische Daten Algen:

Voraussetzung für das Heranziehen eines chronischen Algentestes zur Ableitung eines SF ist ein NOEC/EC₁₀-Wert für eine Testdauer von 3 Tagen.

Theobromin:

Für Theobromin liegen lediglich NOEC-Daten mit kürzerer Testdauer (24 h) vor.

Armleuchteralge (*Chara globularis*):

Theobromin: NOEC (24 h, stat.; Verzögerung der Mitose, zweikernige Zellen, Chromosomenbrüche) = 500 mg/L [Sarma und Tripathi 1976]

Grünalge (*Sphaeroplea annulina*):

Theobromin: LOEC (24 h, stat.; Verklumpung der Chromosomen) = 300 mg/L [Sarma und Chaudhary 1977]

einzellige Algen (Flagellaten, *Gymnodinium inversum*):

Theobromin: NOEC (24 h, stat.; Hemmung der Zellteilung) = 50 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Coffein:

Grünalge (*Desmodesmus subspicatus*):

Coffein: EC₁₀ (72 h, stat.; Biomasse) = 10,2 mg/L (nominal) [OECD 2002]

Coffein: NOEC (72 h, stat.; Biomasse) = 6,25 mg/L (nominal) [OECD 2002]

Cyanobakterien (blaugrüne Algen) in Fluss-Biofilm:

NOEC (56 d, fl.; Abnahme der Cyanobakterien) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012; ECOTOX 2013b]

Algen in Fluss-Biofilm: Coffein: LOEC (56 d; Biomasse) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

div. marine Algen in Symbiose mit Korallen:

Coffein: NOEC³⁴ (40 d, stat.; Wachstum) = 30 mg/L (nominal) [Pollack et al. 2009]

Bucklige Wasserlinse (*Lemna gibba*):

Coffein: NOEC (7 d, semistat.; Biomasse) = 1000 µg/L (nominal) [Brain et al. 2008; ECOTOX 2013b]

Die Voraussetzung für die Berücksichtigung eines chronischen Algentestes zur Ableitung des Sicherheitsfaktors umfasst eine Testdauer zur Ermittlung des NOEC/EC₁₀ von 3 Tagen bzw. 72 h. Diese Voraussetzung wird für Theobromin nicht erfüllt, jedoch für Coffein beim Test mit der Grünalge (*Desmodesmus subspicatus*): NOEC (72 h, stat.; Biomasse) = 6,25 mg/L (nominal).

Im länger durchgeführten Test über 56 Tage mit natürlichem Flusswasser mit Biofilm erwiesen sich als empfindlichste Spezies die Algenpopulation mit LOEC (56 d; Biomasse) = 5 µg/L und Cyanobakterien (blaugrüne Algen) mit NOEC (56 d, fl.; Abnahme der Cyanobakterien) = 5 µg/L.

³⁴ angegeben sind die minimalen Hemmkonzentrationen, = niedrigste Konzentrationen einer Substanz, bei der die Vermehrung der Testorganismen mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden kann

Bakterien und andere Mikroorganismen:

Theobromin:

Augentierchen (*Euglena gracilis*):

Theobromin bewirkt Mutationen [WHO 1991/97]

Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri*):

Theobromin: EC₁₀ (Lumineszenz, Mortalität) = 250 mg/L [GSBL a 2014]

einzellige Algen (Flagellaten, *Gymnodinium inversum*):

Theobromin: NOEC (24 h, stat.; Hemmung der Zellteilung) = 50 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Coffein:

Bakterien im Fluss-Biofilm:

LOEC (56 d, fl.; Biomasse) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

Protozoen-Population in natürlichem Flusswasser-Biofilm (Coffein):

EC (ca. 49 d, stat.; Zunahme (!) des Wachstums) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

LOEC (49 d, stat.; verstärktes Wachstum von Bakterien-Biomasse, Dicke, Exopolymer-Produktion, Abnahme der Cyanobakterien-Biomasse und Änderung der Bakterienpopulations-Zusammensetzung) = 10 µg/L [Lawrence et al. 2012]

LOEC (49 d, stat.; Biomasse, Zusammensetzung der Population) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

Mikrometazoen (Nematoden, Rädertierchen) in Fluss-Biofilm:

NOEC (ca. 49 d, stat.; Zahl der Organismen) = 5 µg/L [Lawrence et al. 2012]

Für Theobromin als auch für andere Methylxanthine liegen sowohl akute (nicht für Theobromin) als auch chronische Bakterientests vor.

Protozoen-Tests können den Basisdatensatz ergänzen, die drei dafür erforderlichen trophischen Ebenen jedoch nicht ersetzen.

Empfindlichste Spezies, getestet mit Theobromin, sind die einzelligen Algen mit einem NOEC (24 h) von 50 mg/L. Getestet mit Coffein sind die empfindlichsten Spezies Nematoden, Rädertierchen und Bakterien im Fluss-Biofilm mit einem NOEC (49 d) von 5 µg/L.

Andere:

Theobromin:

Es liegen zwar keine chronischen Tests mit Theobromin vor, aber die akuten teratogenen Wirkungen von Theobromin am Krallenfrosch sollen hier dennoch aufgeführt werden.

(Anmerkung: Der Krallenfrosch wird im chronischen Test als Organismus zur Prüfung teratogener Wirkungen von Arzneimitteln und anderen chemischen Substanzen eingesetzt (OECD-Guideline 231: The Amphibian Metamorphosis Assay))

Krallenfrosch (*Xenopus laevis*):

Theobromin: LOEC (96 h, stat.; Hemmung des Wachstums) = 60 mg/L [Fort et al. 1998]

Theobromin: LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 75 mg/L (6 von 160 tot, 4 missgebildet [Dawson und Bantle 1987])

Theobromin: LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos: abnormaler Darm, Defekte im Kopf-, Gesichts- und Kieferbereich, Mikrophthalmie³⁵) = 100 mg/L [Fort et al. 1998]
 Theobromin: EC₅₀ (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 150 mg/L [Fort et al. 1998]
 Theobromin: LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos: Muskelabknickung, Mikroenzephalie³⁶, Bauch-Ödeme) = 200 mg/L [Fort et al. 1998]
 Theobromin: LC₅₀ (96 h, stat.; Embryos) = 250 mg/L [Fort et al. 1998]

Coffein:

Auch für Coffein sollen hier die akuten Tests zu teratogenen Wirkungen beim Krallenfrosch mit aufgeführt werden.

Krallenfrosch (*Xenopus laevis*):

LOEC (96 h, stat.; Hemmung des Wachstums) = 50 mg/L [Fort et al. 1998]
 LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 80 mg/L
 (0 von 160 tot, 13 missgebildet) [Dawson und Bantle 1987];
 LOEC (96 h; Hemmung des Wachstums) = 50-125 mg/L (Laborvergleichstest, n=21), Labormittelwerte 50-90 mg/L (n=7) [Bantle et al. 1994];
 EC₅₀ (120 h, semistat.; Missbildungen von Embryos) = 130 mg/L [DeYoung et al. 1996, OECD 2002];
 EC₅₀ (96 h; anormales Wachstum) = 68-218 mg/L (Laborvergleichstest, n=21), Labormittelwerte 74-158 mg/L (n=7) [Bantle et al. 1994];
 NOEC (96 h, semistat.; Wachstum, Missbildungen von Embryos) > 100 mg/L [ECOTOX 2013b; Richards und Cole 2006]
 EC₁₀ (96 h, semistat.; Wachstum, Missbildungen von Embryos) > 100 mg/L [ECOTOX 2013b; Richards und Cole 2006]
 LC₁₀ (96 h, semistat.) > 100 mg/L [ECOTOX 2013b; Richards und Cole 2006]

Leopardfrosch (*Rana pipiens*):

NOEC (28 d, semistat.; Kaulquappen: Gewicht) = 0,60 µg/L [Fraker und Smith 2004; ECOTOX 2013b]

Amerikanische Erdkröte (*Bufo americanus*):

Coffein: NOEC (14 d, semistat.; Mortalität, Aktivität, Gewicht) = 600 µg/L [Smith und Burgett 2005; ECOTOX 2013b]

Theophyllin:

Krallenfrosch (*Xenopus laevis*):

LOEC (96 h, stat.; Hemmung des Wachstums) = 30 mg/L [Fort et al. 1998]

Als empfindlichste Spezies erwies sich der Leopardfrosch mit einem 28-d-NOEC von 0,6 µg/L.

Anmerkung zur Vergleichbarkeit der Toxizitäten der drei Methylxanthine-Derivate:

³⁵ unübliche Kleinheit des Auges

³⁶ verkleinerter Kopf, verkleinertes Gehirn

Die Untersuchungen am Krallenfrosch zeigen, dass die Toxizität der drei Derivate mit LOEC für eine Wachstumshemmung von 30-60 mg/L in der gleichen Größenordnung liegen und sich in den einzelnen teratogenen Wirkungen gleichen. Sie sind damit vergleichbar, was unser Vorgehen, die drei Alkaloide als nahezu gleichwertig zu behandeln, bestätigt.

4.7.3 Zusammenstellung der sensitivsten Daten

Theobromin:

Zebrabärbling (*Danio rerio*):

LC₅₀ (96 h) = 136 mg/L [GSBL a 2014]

NOEC (4 min; Larven, Hemmung der visuomotorischen Aktivität) = 10 mg/L [Ali et al. 2012]

Wasserfloh (*Daphnia magna*):

EC₅₀ (48 h; Schwimmfähigkeit) = 300 mg/L [GSBL a 2014]

EC₀ (48 h; Schwimmfähigkeit) = 140 mg/L [ETOX 2013];

Grünalge (*Sphaeroplea annulina*):

EC (24 h, stat.; Verhalten: Stress) = 300 mg/L [ECOTOX 2013a]

LOEC (24 h, stat.; Verklumpung der Chromosomen) = 300 mg/L
[Sarma und Chaudhary 1977]

einzellige Algen (Flagellaten, *Gymnodinium inversum*):

NOEC (24 h, stat.; Hemmung der Zellteilung) = 50 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

EC₁₀₀ (24 h, stat.; irreversible Unterdrückung der Zellkernteilung) = 500 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

LC (24 h, stat.) = 1000 mg/L [Sarma und Shyam 1975]

Krallenfrosch (*Xenopus laevis*):

LOEC (96 h, stat.; Hemmung des Wachstums) = 60 mg/L [Fort et al. 1998]

LOEC (96 h, stat.; Missbildungen von Embryos) = 75 mg/L
(6 von 160 tot, 4 missgebildet [Dawson und Bantle 1987])

Augentierchen (*Euglena gracilis*):

Theobromin bewirkt Mutationen [WHO 1991/97]

Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri*):

Theobromin: EC₁₀ (Lumineszenz, Mortalität) = 250 mg/L [GSBL a 2014]

Coffein und Theophyllin:

Die nachfolgend aufgeführten Tests wurden alle mit Coffein durchgeführt:

Goldfisch (*Carassius auratus*):

NOEC (7 d, semistat.; Erhöhung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität) = 3,2 µg/L
[ECOTOX 2013b, Li et al. 2012];

NOEC (7 d, semistat.; Acetylcholinesterase-Hemmung) = 16 µg/L
[ECOTOX 2013b; Li et al. 2012]

LOEC (1-7 d, semistat.; **Anstieg** der Aktivität des Enzyms 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD) = 3,2 µg/L
(ab 400 µg/L **Verringerung** der Aktivität) [ECOTOX 2013b; Li et al. 2012]

Dickkopflritze (Fathead Minnow, *Pimephales promelas*):

Coffein: LC₅₀ (7 d, semistat.) = 55 mg/L [Moore et al. 2008]
Coffein: EC₅₀ (7 d, semistat.; Wachstum) = 71 mg/L [Moore et al. 2008]

Wasserfloh (*Daphnia magna*):

EC₃₀ (72 h, semistat.; Vitellogenin-Bildung) = 18,2 mg/L
[ECOTOX 2013b; Hannas et al. 2011]

Wasserfloh (*Ceriodaphnia dubia*):

LC₅₀ (48 h, stat.) = 60 mg/L [Moore et al. 2008]
EC₅₀ (7 d, semistat.; Reproduktion) = 44 mg/L [Moore et al. 2008]

Kalifornische Miesmuschel (*Mytilus californianus*):

LOEC (30 d, semistat.; **Kiemenlamellen**: zellulärer Stress) = 0,05 µg/L
[del Rey et al. 2011]

NOEC (30 d, semistat.; **Mantelgewebe**: zellulärer Stress) = 0,5 µg/L
[del Rey et al. 2011]

Kanadische Flussmuschel (*Elliptio complanata*):

LOEC (48 h, stat.; Dibenzylfluorescein-Dealkylase) = 15,5 mg/L
[Martín-Díaz et al. 2009]

Gemeine Strandkrabbe (*Carcinus maenas*):

LOEC (28 d, semistat.; Anstieg der Aktivität des Enzyms 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD, in
Hepatopankreas und Gonaden; DNA-Schädigung in Kiemen) = 0,1 µg/L,
dosisabhängige Korrelation bei 0,1, 5, 15 und 50 µg/L [Aguirre-Martínez et al. 2013a]

NOEC (28 d, semistat.; DNA-Schädigung in Hepatopankreas und Muskel) = 5 µg/L
[Aguirre-Martínez et al. 2013a]

Grünalge (*Desmodesmus subspicatus*):

EC₁₀ (72 h, stat.; Biomasse) = 10,2 mg/L [OECD 2002]
EC₅₀ (72 h, stat.; Biomasse) > 100 mg/L [OECD 2002]
NOEC (72 h, stat.; Biomasse) = 6,25 mg/L [OECD 2002]

Cyanobakterien (blaugrüne Algen) in Flusswasser-Biofilm:

NOEC (56 d, fl.; Abnahme der Cyanobakterien in Biofilm) = 5 µg/L
[Lawrence et al. 2012; ECOTOX 2013b]

Mikrometazoen (Nematoden, Rädertierchen):

NOEC (ca. 49 d, stat.; Zahl der Organismen) = 5 µg/L
[Lawrence et al. 2012]

Algen in Fluss-Biofilm: Coffein: LOEC (56 d; Biomasse) =

5 µg/L
[Lawrence et al. 2012]

Leopardfrosch:

LOEC (28 d, semistat.; Kaulquappen: Aktivität) = 0,60 µg/L (vermindert) bzw.
600 µg/L (erhöht) (signifikant) [Fraker und Smith 2004]

LOEC (28 d, semistat.; Kaulquappen: erhöhte Schreckreaktion) = 0,60 µg/L (
signifikant) [Fraker und Smith 2004]

NOEC (28 d, semistat.; Kaulquappen: Gewicht) = 0,60 µg/L
[Fraker und Smith 2004; ECOTOX 2013b]

LOEC (28 d, semistat.; Kaulquappen: Gewicht) = 6,0 µg/L (nicht
signifikant) [Fraker und Smith 2004; ECOTOX 2013b]

Amerikanische Erdkröte (*Bufo americanus*):

NOEC (14 d, semistat.; Kaulquappen: Mortalität, Aktivität, Gewicht) = 600 µg/L
[Smith und Burgett 2005; ECOTOX 2013b]

4.7.4 Bewertung der Daten und Ableitung des Sicherheitsfaktors (SF)

1. Berücksichtigung der ökotoxikologischen Tests nur für Theobromin (außer Acht lassen der Daten zu den chemisch eng verwandten Methylxanthinen Coffein und Theophyllin):

Der Basisdatensatz mit akuten Daten zu den 3 trophischen Ebenen Fische, Invertebraten und Algen ist nicht ganz vollständig, da die vorliegenden akuten Daten für die Alge aufgrund der abweichenden Testdauer nur eingeschränkt verwendet werden können.

Bei den vorliegenden **Algentests** zu Armleuchter- und Grünalge liegen akute NOEC- und LOEC-Angaben im Bereich von 500-100 mg/L vor; die aufgeführten Dauern der Tests stimmen nicht mit den vorgeschriebenen Testzeiten von 72 h überein.

Für die 24h-Effekt- und Letalkonzentrationen für Grünalge und die einzellige Alge von 300 bzw. 1000 mg/L werden keine Angaben darüber gemacht, wieviele der eingesetzten Test-Organismen betroffen sind.

Folgerung: es kann keine Bewertung vorgenommen werden, weil die Voraussetzungen für einen SF von 1000 nicht gegeben sind.

Aufforderung: Durchführung eines akuten Algentestes

Nach Vorliegen des Algentestes könnte ein SF von mind. 1000 gesetzt werden.

Aufgrund der vorliegenden Daten kann für eine EC₅₀/LC₅₀-Angabe mind. ein Wert im Bereich von 300-1000 mg/L vermutet werden.

Chronische Daten:

Für Fische, Daphnien und Algen (lediglich 24h-Tests) liegen keine chronischen Daten vor.

Empfindlichste Werte liegen vor für den Zebraabräbling mit einem NOEC (4 Min.) von 10 mg/L, die einzelligen Algen mit einem NOEC (24 h) von 50 mg/L und den Krallenfrosch mit einem LOEC von 60 mg/L.

Über eine eingeschränkte Ableitung eines GFS_{aquat} für Theobromin mit einem SF 1000 kann eine GFS_{aquat} = 10 µg/L abgeschätzt werden.

Angesichts der im Folgenden zusammengefassten Daten zu Coffein ist anzunehmen, dass diese GFS_{aquat} nicht die sensibelsten Wirkungen von Theobromin erfasst.

2. Berücksichtigung aller ökotoxikologischen Tests mit Theobromin und der Tests mit den beiden strukturähnlichen Derivaten Coffein (und Theophyllin):

Für das strukturverwandte Coffein wurde eine PNEC (Predicted-no-effect-concentration) von 0,0199 µg/L = 19,9 ng/L auf Basis einer EC₅₀ (28 d) mit einem Sicherheitsfaktor 1000 abgeleitet [Aguirre-Martínez et al. 2013b].

Als empfindlich erwiesen sich fünf trophische Ebenen. Die niedrigsten Werte (0,05- 5 µg/L) wurden beobachtet für

- Fische bei 3,2 µg/L,
- Invertebraten bei 0,05-0,1 µg/L (Strandkrabbe 0,1 µg/L, Miesmuschel 0,05 µg/L),
- Algen bei 5 µg/L (Cyanobakterien, blaugüne Algen, Biofilm),
- Amphibien bei 0,6 µg/L (Leopardfrosch),
- Mikroorganismen bei 5 µg/L (Nematoden, Rädertierchen, Biofilm).

Die empfindlichsten Daten liegen für die Invertebraten mit LOEC = 0,05 µg/L (Kaliforn. Miesmuschel) und LOEC = 0,1 µg/L (Gemeine Strandkrabbe) vor.

Wegen der starken Abweichung der Versuchsanordnung und der geprüften Spezies vom üblichen Bewertungsschema werden die Ergebnisse zur Langzeit-Populationsentwicklung (7-8 Wochen) der Algen und Mikroorganismen im Biofilm nicht zur GFS-Ableitung herangezogen.

Ableitung des Sicherheitsfaktors:

Nachfolgend sind die niedrigsten akuten und chronischen (Effekt)-Konzentrationen für die einzelnen trophischen Ebenen tabellarisch zusammengestellt, wobei die Minimum-Konzentrationen für akute und chronische Daten grau unterlegt sind:

	Theobromin	Coffein
LC ₅₀ Fisch	136 mg/L [*]	87 mg/L [*]
EC ₅₀ Invertebraten	300 mg/L [*]	60 mg/L
EC ₅₀ Alge	300 mg/L ¹	>100 mg/L ⁵
LOEC/NOEC Invertebraten	140 mg/L ²	44 mg/L / 0,05 µg/L ⁶ und 0,1 µg/L ⁷
LOEC/NOEC Amphibien	60 bzw. 75 mg/L ³	0,6 µg/L ⁸
NOEC Alge	50 mg/L ⁴	6,25 mg/L ⁵ / 5 µg/L ⁹

- * vorgeschriebene Testdauer eingehalten
- 1 24 h statt 3 d Grünalge *Sphaeroplea ann.*
- 2 48 h³⁷ statt 21 d, *Daphnia magna*
- 3 96 h Wachstum bzw. Missbildungen von Embryos des Krallenfrosches
- 4 24 h statt 3 d, einzellige Alge
- 5 Grünalge *Desmodesmus subspicatus*
- 6 30d-LOEC Miesmuschel *Mytilus californianus* (Zwischenhäutungsphase), keine Testdauer vorgeschrieben
- 7 28d-LOEC Strandkrabbe (adulte Tiere), keine Testdauer vorgeschrieben
- 8 28 d Leopardfrosch, vorgeschriebene Dauer (für Krallenfrosch) 21 d
- 9 56 d Cyanobakterie blaugüne Alge, vorgeschriebene Testdauer 72 h

Bei Vorliegen des Basisdatensatzes sowie chronischer Daten für zwei trophische Ebenen ist gemäß TGD 2011 zu entscheiden, ob ein Sicherheitsfaktor von 100, 50 oder im Ausnahmefall 10 angewandt wird.

Formal leitet sich gemäß $\text{NOEC}_{\text{chron. min}} \text{ Invertebrate} + \text{EC}_{50 \text{ akut min}} \text{ Invertebrate} + \text{NOEC}_{\text{chron. Alge}}$ ein Sicherheitsfaktor von 50 ab:

³⁷ EC₀ bezogen auf Schwimmfähigkeit kann NOEC gleichgesetzt werden

Chronische Daten liegen für Fische keine vor; die max. Testdauern liegen bei den vorhandenen Tests bei max. 7d und können daher hier nicht berücksichtigt werden.

Bei den Invertebraten erfüllt die 7d-Testdauer beim Wasserfloh (*Ceriodaphnia dubia*) die Anforderungen an einen chronischen Test, bei den anderen Tests liegen die Testdauern von 28-30 d oberhalb der vorgeschriebenen 21 d.

Bei den Algen liegt für Coffein ein chronischer Test vor, der den Anforderungen gerecht wird.

Die Unsicherheit der SF-Ableitung ist allgemein geringer, wenn die getesteten Endpunkte besonders relevant für den Wirkmechanismus der Testsubstanz sind und die Testsubstanz nicht bioakkumuliert. In solchen Fällen kann ein geringerer Sicherheitsfaktor angemessen sein [TGD 2011, Gühr und Rippen 2014]. Dies gilt eindeutig im vorliegenden Fall:

- Die Bioakkumulation ist gering.
- Die niedrigsten Effekt- und No-Effekt-Werte mit den zugleich sensibelsten Endpunkten auch bei der Betrachtung der Humantoxikologie erbrachten die Ökotoxizitätstests an Invertebraten und Amphibien

Die stärksten Wirkungen von Coffein an der Kalifornischen Miesmuschel und der Strandkrabbe beruhen auf ähnlichen bzw. den gleichen Mechanismen wie die Wirkungen von Theobromin und Coffein auf Säugetiere: zum einen auf einer Störung von Enzymfunktionen wie z.B. der Hemmung der Phosphodiesterase; s. Abschnitt 3.3.2.2), zum anderen auf einer DNA-Schädigung (s. Mutagenitätstests, Abschnitt 3.4.4, und DNA-Schädigung von Krebszellen durch Theobromin, s. Abschnitt 3.4.5)

Amphibien werden üblicherweise geprüft, um Aussagen zu endokrinen (hormonartigen) bzw. reproduktionstoxischen Wirkungen an Wirbeltieren und dem Menschen zu gewinnen (s. OECD-Prüfrichtlinie 231 [OECD 2009]). Wie im Abschnitt 3.4.2 dargestellt, löst Theobromin in Säugetieren endokrine Wirkungen aus (irreversible Zerstörung der Thymusdrüse und männlicher Geschlechtsorgane) und ist wie auch die anderen Methylxanthine im Tierversuch eindeutig reproduktionstoxisch (u.a. teratogen; s. Abschnitt 3.4.3).

DNA-Schädigung und Teratogenität sind deshalb als Substanzgruppen-spezifischen Wirkmechanismen anzusehen. Mit den Tests zur Wirkung des Coffeins auf Invertebraten und Amphibien wurden somit mit großer Wahrscheinlichkeit die sensibelsten Endpunkte der Methylxanthin-Toxizität getestet. Die niedrigsten LOEC-Werte (0,05 bzw. 0,1 µg/L) für die Wirkungen an der Kalifornischen Miesmuschel und der Strandkrabbe sind deshalb plausibel, und der Sicherheitsfaktor kann deutlich reduziert werden. Ein Faktor **20** (statt 50) erscheint ausreichend (mindestens Faktor 10, dazu Faktor 2 zur Extrapolation von LOEC auf NOEC). Da vorrangig der Endpunkt „DNA-Schäden“ populationsrelevant ist, wird der Faktor nicht auf das Ergebnis „zellulärer Stress“ bei der Miesmuschel (0,05 µg/L) angewandt, sondern auf „dosisabhängige DNA-Schäden“ bei der Strandkrabbe:

GFS_{aquat} (vorläufig) = 5 ng/L.

Diese vorläufige GFS sollte abgesichert werden durch zusätzliche nachzufordernde Prüfungsergebnisse zur **Langzeit-Wirkung von Theobromin auf Amphibien und Invertebraten** (an Stelle der Daten zum hier ersatzweise bewerteten Coffein).

Die OECD-Prüfrichtlinie 231 [OECD 2009] schreibt für den Test mit Amphibien eine Testdauer von 21 Tagen und die Beobachtung der folgenden Endpunkte vor:

- Mortalität (täglich)
- Entwicklungsstadium (Tag 7 und 21)
- Hintergliedmaße (Tag 7 und 21)
- Kopfrumpflänge (Tag 7 und 21)
- Körpergewicht (Tag 7 und 21)
- Schilddrüsenhistologie (Tag 21)

Die festgestellte Wirkung „dosisabhängige DNA-Schäden“ von Coffein auf Invertebraten ist so gravierend, dass ein analoger Test mit der Strandkrabbe auch mit Theobromin als Testsubstanz ausgeführt werden sollte. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, weil DNA-Schäden durch Coffein nicht nur an der Strandkrabbe und auch an der Kanadischen Flussmuschel beobachtet wurden, sondern auch mit Theobromin, sowohl *in vitro* bei Mutagenitätstests als auch als DNA-Schädigung von Krebszellen *in vivo*. Hier ist von einem Substanzgruppen-spezifischen Wirkmechanismus auszugehen!

Theoretisch ist es sinnvoll einen chronischen Fishtest durchzuführen, der den SF auf 10 reduzieren könnte. Da jedoch die Minimalwerte für NOEC und EC₅₀ nicht auf der trophischen Ebene der Fische zu finden sein werden, kann hierüber der SF von 20 nicht unterschritten werden.

Aus einem Vergleich der vorläufigen GFS zum Schutz des Menschen (GFS_{human} = 40 µg/L, s. Kapitel 3.5) und der vorläufigen GFS zum Schutz aquatischer Lebewesen (GFS_{aquat} = 5 ng/L) resultiert als niedrigerer Wert von beiden der vorläufige Geringfügigkeitsschwellenwert

GFS (vorläufig) = 5 ng/L.

5 Verwendete Literatur

- Abdelkader, T.S.; Chang, S.N.; Kim, T.H.; Song, J.; Kim, D.S.; Park, J.H. (2012): Exposure time to caffeine affects heartbeat and cell damage-related gene expression of zebrafish *Danio rerio* embryos at early developmental stages. *J. Appl. Toxicol.* Aug 9. doi: 10.1002/jat.2787 (Kurzfassung, publiziert vor dem Druck)
- Abdi, F.; Pollard, I.; Wilkinson, J. (1993): Placental transfer and foetal disposition of caffeine and its immediate metabolites in the 20-day pregnant rat: function of dose. *Xenobiotica* 23 (4): 449-456
- Aguirre-Martínez, G.V.; Salamanca, M.J.; Del Valls, T.A.; Martín-Díaz, M.L. (2010): Stability Biological and biochemical responses of *Carcinus maenas*: A consequence of pharmaceutical exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part A, Physiology* 157: 16-17
- Aguirre-Martínez, G.V.; Del Valls, T.A.; Martín-Díaz, M.L. (2013a): Identification of biomarkers responsive to chronic exposure to pharmaceuticals in target tissues of *Carcinus maenas*. *Mar. Environ Res.* 87-88: 1-11
- Aguirre-Martínez, G.V.; Buratti, S.; Fabbri, E.; Del Valls, T.A.; Martín-Díaz, M.L. (2013b): Stability of lysosomal membrane in *Carcinus maenas* acts as a biomarker of exposure to pharmaceuticals. *Environ. Monit. Assess.* 185 (5): 3783-3793
- Ali, S.; van Mil, H.G.J.; Richardson, M.K. (2011): Large-Scale Assessment of the Zebrafish Embryo as a Possible Predictive Model in Toxicity Testing. *PLoS ONE* 6 (6): e21076. doi:10.1371/journal.pone.0021076
- Ali, S.; Champagne, D.L.; Richardson, M.K. (2012): Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behav. Brain Res.* 228 (2): 272-283
- Amaechi, B.T.; Porteous, N.; Ramalingam, K.; Mensinkai, P.K.; Ccahuana Vasquez, R.A.; Sadeghpour, A.; Nakamoto, T. (2013): Remineralization of Artificial Enamel Lesions by Theobromine. *Caries Res.* 47 (5): 399-405
- Anonym (2013): Hornissen - Maße, Daten & Fakten. www.hornissenschutz.de und www.vespa-crabro.de; aktualisiert am 01.11.2013
- Baggott, M.J.; Childs, E.; Hart, A.B.; de Bruin, E.; Palmer, A.A.; Wilkinson, J.E.; de Wit, H. (2013): Psychopharmacology of Theobromine in Healthy Volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 228 (1): 109-118
- Bantle, J. A.; Burton, D. T.; Dawson, D. A.; Dumont, J. N.; Finch, R. A.; Fort, D. J.; Linder, G.; Rayburn, J. R.; Buchwalter, D.; Gaudet-Hull, A. M.; Maurice, M. A.; Turley, S. D. (1994): FETAX Interlaboratory Validation Study: Phase II Testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13 (10): 1629-1637
- Barcz, E.; Sommer, E.; Sokolnicka, I.; Gawrychowski, K.; Roszkowska-Purska, K.; Janik, P.; Skopinska-Różewska, E. (1998): The influence of theobromine on angiogenic activity and proangiogenic cytokines production of human ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* 5(2): 517-520
- Barcz, E.; Sommer, E.; Nartowska, J.; Balan, B.; Chorostowska-Wynimko, J.; Skopińska-Różewska, E. (2007): Influence of Echinacea purpurea intake during pregnancy on fetal growth and tissue angiogenic activity. *Folia Histochem. Cytobiol.* 45 Suppl 1: 35-39
- Bishop, D.T.; Meikle, A.W.; Slattery, M.L.; Stringham, J.D.; Ford, M.H.; West, D.W. (1988): The effect of nutritional factors on sex hormone levels in male twins. *Genet. Epidemiol.* 5 (1): 43-59
- Brain, R.A.; Hanson, M.L.; Solomon, K.R.; Brooks, B.W. (2008): Aquatic Plants Exposed to Pharmaceuticals: Effects and Risks. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192: 67-115
- Brambilla, G.; Mattioli, F.; Robbiano, L.; Martelli, A. (2012): Update of Carcinogenicity Studies in Animals and Humans of 535 marketed pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 750 (1): 1-51
- Brambilla, G.; Mattioli, F.; Robbiano, L.; Martelli, A. (2013): Genotoxicity and carcinogenicity studies of bronchodilators and antiasthma drugs. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 112 (5): 302-313
- Bützer, P. (2003): Coffein. www.swisseduc.ch/chemie/schwerpunkte/coffein/docs/coffein.pdf

- Buscicchio, G.; Lorenzi, S.; Tranquilli, A.L. (2013): The effects of different concentrations of cocoa in the chocolate intaken by the mother on fetal heart rate. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 26 (15): 1465-1467
- Byfield, J.E.; Murnane, J.; Ward, J.F.; Calabro-Jones, P.; Lynch, M.; Kulhanian, F. (1981): Mice, men, mustard and methylated xanthines: the potential role of caffeine and related drugs in the sensitization of human tumours to alkylating agents. *Br. J. Cancer* 43 (5): 669-683
- Calleja, M.C.; Persoone, G.; Geladi, P.: Comparative Acute Toxicity of the first 50 Multicentre Evaluation of In vitro Cytotoxicity Chemicals to Aquatic Non-Vertebrates (1994). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 69-78
- Chakraborty, C.; Hsu, C.H.; Wen, Z.H.; Lin, C.S.; Agoramoorthy, G. (2011): Effect of caffeine, norfloxacin and nimesulide on heartbeat and VEGF expression of zebrafish larvae. *J. Environ. Biol.* 32 (2): 179-183
- Chen, Y.H.; Huang, Y.H.; Wen, C.C.; Wang, Y.H.; Chen, W.L.; Chen, L.C.; Tsay, H.J. (2008): Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicol Teratol.* 30 (5): 440-447
- Chorostowska-Wynimko, J.; Skopińska-Rózewska, E.; Sommer, E.; Rogala, E.; Skopiński, P.; Wojtasik, E.: Multiple effects of theobromine on fetus development and postnatal status of the immune system (2004). *Int. J. Tissue React.* 26 (1-2): 53-60
- Christian, M.S.; Brent, R.L. (2001): Teratogen Update: Evaluation of The Reproductive and Developmental Risks of Caffeine. *Teratology* 64 (1): 51-78
- Crisp, K.M.; Grupe, R.E.; Lobsang, T.T.; Yang, X.: Biogenic Amines Modulate Pulse Rate in the Dorsal Blood Vessel of *Lumbricus variegatus* (2010). *Comp. Biochem. Physiol. C* 151: 467-472
- Cunningham, V.L.; Buzby, M.; Hutchinson, T.; Mastrococco, F.; Parke, N.; Roden, N.: Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps (2006). *Environ. Sci. Technol.* 40: 3456-3462; Supporting Information
- Dawson, D.A.; Bantle, J.A. (1987): Coadministration of Methylxanthines and Inhibitor Compounds Potentiates Teratogenicity in *Xenopus* Embryos. *Teratology* 35 (2): 221-227
- del Rey, Z.R.; Granek, E.F.; Buckley, B.A. (2011): Expression of HSP70 in *Mytilus californianus* following exposure to caffeine. *Ecotoxicology* 20 (4): 855-861
- DeYoung, D.J.; Bantle, J.A.; M. A. Hull, M.A.; S. L. Burks, S.L.: Differences in Sensitivity to Developmental Toxicants as Seen in *Xenopus* and *Pimephales* Embryos (1996). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 143-150
- DFG (2014): Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 50. MAK- und BAT-Werte-Liste 2014. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Weinheim: Wiley-VCH 2014
- CCRIS (2013): U.S. National Library of Medicine, Chemical Carcinogenesis Research Information System (CCRIS): Theobromine, CASRN: 83-67-0. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. Stand November 2013
- ECOTOX (2013a): U.S. Environmental Protection Agency: ECOTOXicology Database (ECOTOX). Version 4. Quick Database Query. Aquatic Report. CAS #/Chemical: 83670 – Theobromine. 3 Einträge. Stand Oktober 2013. http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm
- ECOTOX (2013b): U.S. Environmental Protection Agency: ECOTOXicology Database (ECOTOX). Version 4. Quick Database Query. Aquatic Report. CAS #/Chemical: 58082 - 3,7-Dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-pyrimidine-2,6-dione. 142 Einträge. Stand Oktober 2013. http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm
- ECOTOX (2013c): U.S. Environmental Protection Agency: ECOTOXicology Database (ECOTOX). Version 4. Quick Database Query. Aquatic Report. CAS #/Chemical: 58559 - 3,7-Dihydro-1,3-dimethyl-1H-purine-2,6-dione. 8 Einträge. Stand November 2013. http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm

ESIS (2013): Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection (CP): ESIS: European chemical Substances Information System. <http://esis.jrc.ec.europa.eu/>. Stand Dezember 2013

European Food Safety Authority (EFSA): Theobromine as undesirable substances in animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. (Wissenschaftliches Gutachten des Gremiums für Kontaminanten in der Lebensmittelkette zu Theobromin als unerwünschte Substanz in Tierfuttermitteln auf Ersuchen der Europäischen Kommission). EFSA Journal 725: 1-66 (2008).

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/725.pdf>

Deutsche Zusammenfassung:

http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/contam_op_ej725_theobromine_summary_de.pdf

Fent, K.; Weston, A.A.; Caminada, D. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76 (2): 122-159; zitiert von [Lawrence et al. 2012]

Fort, D.J.; Stover, E.L.; Propst, T.L.; Faulkner, B.C.; Vollmuth, T.A.; Murray, F.J. (1998): The Developmental Toxicities of Caffeine and 13 Metabolites, Using the Frog Embryo Teratogenesis Assay – *Xenopus* (FETAX). *Food Chem. Toxicol.* 36 (7): 591-600

Fraker, S.L.; Smith, G.R. (2004): Direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* tadpoles. *Environ. Toxicol.* 19 (3): 250-256

Franco, R.; Oñatibia-Astibia, A.; Martínez-Pinilla, E. (2013): Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. *Nutrients* 5 (10): 4159-4173

Friedman, L.; Weinberger, M.A.; Farber, T.M.; Moreland, F.M.; Peters, E.L.; Gilmore, C.E.; Khan, M.A. (1978): Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxanthines caffeine, theobromine, or theophylline. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1 (5): 669-688

Frischknecht, P. M.; Ulmer-Dufek, J.; Baumann, T.W. (1986): Purine formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: Expression of an optimal defence strategy? *Phytochemistry.* 25 (3): 613–616; zitiert in WIKIPEDIA Coffein (2013)

Funabashi, H.; Fujioka, M.; Kohchi, M.; Tateishi, Y.; Matsuoka, N. (2000): Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 22 Effects of 2 and 4 week administration of theobromine on the testis. *J. Toxicol. Sci.* 25 (Special Issue): 211-221

Fung, T.T.; Hu, F.B.; Barbieri, R.L.; Willett, W.C.; Hankinson, S.E. (2007): Dietary patterns, the Alternate Healthy Eating Index and plasma sex hormone concentrations in postmenopausal women. *Int. J. Cancer* 121 (4): 803-809.

Gans, J.H.; Korson, R.; Cater, M.R.; Ackerly, C.C. (1980): Effects of short-term and long-term theobromine administration to male dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53 (3): 481-496

Gans, JH. (1984): Comparative toxicities of dietary caffeine and theobromine in the rat. *Food Chem Toxicol.* 22 (5): 365-369

GSBL a 2014: Gemeinsamer Stoffdatenpool Bund/Länder (GSBL): Theobromin. Stand Januar 2014. <http://www.gsbl.de/gsblweb30/main.do>.

GSBL b 2014: Gemeinsamer Stoffdatenpool Bund/Länder (GSBL): Guaranine. Stand Januar 2014. <http://www.gsbl.de/gsblweb30/main.do>.

Giannandrea, F. (2009): Correlation analysis of cocoa consumption data with worldwide incidence rates of testicular cancer and hypospadias. *Intern. J. Environ. Res. Publ. Health* 6, 568-578

Gühr, R.; Rippen, G. (2014): Geringfügigkeitsschwellenwerte (GFS-Werte) aus ökotoxikologischen Daten – hier: Ableitung von Sicherheitsfaktoren für Predicted No Effect Concentrations (PNEC) nach TGD 2011. In Vorbereitung

- Giri, A.K.; Das, M.; Reddy, V.G.; Pal, A.K. (1999): Mutagenic and genotoxic effects of theophylline and theobromine in *Salmonella* assay and *in vivo* sister chromatid exchanges in bone marrow cells of mice. *Mutat. Res.* 444 (1): 17-23
- Gómez-Martínez, L.E. (2011): Disposition kinetics of caffeine and paraxanthine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): characterization of the main metabolites. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60 (4): 654-664
- Gutiérrez-Sánchez, G.; Roussos, S.; Augur, C. (2013): Effect of caffeine concentration on biomass production, caffeine degradation, and morphology of *Aspergillus tamarii*. *Folia Microbiol (Praha)* 58 (3):195-200
- Hannas, B.R.; Wang, Y.H.; Thomson, S.; Kwon, G.; Li, H.; Leblanc, G.A. (2011): Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*). *Aquat. Toxicol.* 101 (2): 351-357
- Hart, A. and Grimble, R.F. (1990). The effects of methylxanthines on milk volume and composition, and growth of rat pups. *Br. J. Nutr.* 64: 339-350
- Hostetler, K.A.; Morrissey, R.B.; Tarka, S.M., Jr.; Apgar, J.L.; Shively, C.A. (1990): Three-generation reproductive study of cocoa powder in rats. *Food Chem Toxicol.* 28 (7): 483-490
- HSDB (2013): Hazardous Substances Data Bank (HSDB) No. 7332: Theobromine. CASRN: 83-67-0. Letzte Revision 27.02.2006. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. Stand November 2013
- Ishay, J.S.; Paniry, V.A. (1979): Effects of caffeine and various xanthines on hornets and bees. *Psychopharmacology (Berl)* 65 (3): 299-309
- Ishay, J.S.; Shimony, T.B.; Schechter, O.S.; Brown, M.B. (1981): Effects of xanthines and colchicine on the longevity, photoconductive properties and yellow pigment structure of the oriental hornet *Vespa Orientalis* L. *Toxicology* 21 (2): 129-140
- International Uniform Chemical Information Database (IUCLID): List of the 7840 EU Low Production Volume Chemicals. Stand 09/2000. Office for Official Publications of the European Communities, L-2985 Luxembourg. Catalog No. LB-NA-19-559-EN-Z; ISBN 92-828-8647-7
- Johnson, I.M.; Prakash, H.; Prathiba, J.; Raghunathan, R.; Malathi, R. (2012): Spectral analysis of naturally occurring methylxanthines (theophylline, theobromine and caffeine) binding with DNA. *PLoS One* 7, e50019. <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0050019>
- Kang, H.J.; Kim, H.S.; Choi, K.H.; Kim, K.T.; Kim, P.G. (2005): Several Human Pharmaceutical Residues in Aquatic Environment May Result in Endocrine Disruption in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Kor. J. Environ. Health* 31 (3): 227-233
- Kargul, B.; Ozcan, M.; Peker, S.; Nakamoto, T.; Simmons, W.B.; Falster, A.U. (2012): Evaluation of human enamel surfaces treated with theobromine: A pilot study. *Oral Health Prev. Dent.* 10: 275–282.
- Kelich, A. (2013a): Theobromin. In: Enzyklopaedie der Drogen. HTML-Datenbank. <http://catbull.com/alamut/Lexikon/Mittel/Koffein.htm>. Stand November 2013
- Kelich, A. (2013b): Koffein. In: Enzyklopaedie der Drogen. <http://catbull.com/alamut/Lexikon/Mittel/Koffein.htm>. Stand November 2013
- Knöbel, M.; Busser, F.J.M.; Rico-Rico, Á.; Kramer, N.I.; Hermens, J.L.M.; Hafner, C.; Tanneberger, K.; Schirmer, K.; Scholz, S. (2012): Predicting Adult Fish Acute Lethality with the Zebrafish Embryo: Relevance of Test Duration, Endpoints, Compound Properties, and Exposure Concentration Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 46 (17): 9690-9700
- Lamb, J., Gulati, D., Choudhury, H., Chambers, R., Poonacha, K. and Sabharwal, P. (1997): Theobromine. *Environ. Health Perspect.* 105 (Suppl. 1): 353-354

- Lawrence, J.R.; Zhu, B.; Swerhone, G.D.; Roy, J.; Tumber, V.; Waiser, M.J.; Topp, E.; Korber, D.R. (2012): Molecular and Microscopic Assessment of the Effects of Caffeine, Acetaminophen, Diclofenac, and Their Mixtures on River Biofilm Communities. *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 508-517
- León-Carmona, J. R.; Galano, A. (2012): Free radical scavenging activity of caffeine's metabolites. *Int. J. Quantum Chem.* 112 (21): 3472–3478
- Li, Z.; Lu, G.; Yang, X.; Wang, C. (2012): Single and Combined Effects of Selected Pharmaceuticals at Sublethal Concentrations on Multiple Biomarkers in *Carassius auratus*. *Ecotoxicol.* 21: 353-361
- Lilius, H.; Isomaa, B.; Holmstrom, T.: A Comparison of the Toxicity of 50 Reference Chemicals to Freshly Isolated Rainbow Trout Hepatocytes and *Daphnia magna* (1994). *Aquat. Toxicol.* 30: 47-60
- Lilius, H.; Hastbacka, T.; Isomaa, B.: A Comparison of the Toxicity of 30 Reference Chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex* (1995). *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 2085-2088
- Martín, I.; López-Vílchez, M.A.; Mur, A.; García-Algar, O.; Rossi, S.; Marchei, E.; Pichini, S. (2007): Neonatal withdrawal syndrome after chronic maternal drinking of mate. *Ther. Drug Monit.* 29 (1): 127-129
- Martín-Díaz, M.L.; Gagné, F.; Blaise, C. (2009): The use of biochemical responses to assess ecotoxicological effects of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) after injection in the mussel *Elliptio complanata*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28 (2): 237-242
- Matsagas, K.; Lim, D.B.; Horwitz, M.; Rizza, C.L.; Mueller, L.D.; Villeponteau, B.; Rose, M.R. (2009): Long-Term Functional Side-Effects of Stimulants and Sedatives in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 4(8): e6578. doi:10.1371/journal.pone.0006578
- Miyashira, C.H.; Tanigushi, D.G.; Gugliotta, A.M.; Santos, D.Y. (2012): Influence of caffeine on the survival of leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* and in vitro growth of their mutualistic fungus. *Pest. Manag. Sci.* 68 (6): 935-940
- Moore, M.T.; Greenway, S.L.; Farris, J.L.; Guerra, B. (2008): Assessing Caffeine as an Emerging Environmental Concern Using Conventional Approaches. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54 (1): 31-35
- Morrow, D.; Corrigan, D.; Waldren, S. (2001): Development of a bioassay for phytochemicals using *Daphnia pulex*. *Planta Med.* 67 (9): 843-846
- Nathanson, J.A. (1984): Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science* 226 (4671): 184-187
- Nehlig, A.; Debry, G. (1994): Potential Teratogenic and Neurodevelopmental Consequences of Coffee and Caffeine Exposure: A Review on Human and Animal Data. *Neurotoxicol. Teratol.* 16 (6): 531-543
- Neufingerl, N.; Zebregs, Y.E.; Schuring, E.A.; Trautwein, E.A. (2013): Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 97 (6): 1201-1209
- NTP (1998): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health: National Toxicology Program – NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Theophylline (CAS No. 58-55-9) in F344/N Rats and B6c3f Mice (Feed and Gavage Studies). NTP TR 473. 1998
- OECD 2002: SIDS Initial Assessment Report for SIAM 14. Caffeine. CAS 58-08-2. UNEP Publ. 2002. <http://webnet.oecd.org/HPV/UI/handler.axd?id=cedcd78d-4ddd-4a9c-b0f0-3b53f8fd5495>
- OECD 2009: OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 231: The Amphibian Metamorphosis Assay. Adopted Sept. 2009
- Oehlmann, J. (2014): persönliche Mitteilung, Juli 2014

- Quinn, B.; Gagné, F.; Blaise, C.: An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata* (2008a). *Sci. Total Environ.* 389: 306-314
- Quinn, B.; Gagné, F.; Blaise, C.: The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuata* (2008b). *Sci. Total Environ.* 402: 62-69
- Pollack, K.; Balazs, K.; Ogunseitán, O. (2009): Proteomic Assessment of Caffeine Effects on Coral Symbionts. *Environ. Sci. Technol.* 43 (6): 2085-2091
- Rand, G.M.: Aquatic Toxicity Testing Studies Conceptual Plan. Appendix C. <http://www.miamidade.gov/water/library/reports/coastal-wetlands-conceptual-appendix-c.pdf>. 2007
- Resman, B.H.; Blumenthal, P.; Jusko, W.J. (1977): Breast milk distribution of theobromine from chocolate. *J. Pediatr.* 91 (3): 477-480
- Richards, S.M.; Cole, S.E.: A Toxicity and Hazard Assessment of Fourteen Pharmaceuticals to *Xenopus laevis* Larvae (2006). *Ecotoxicol.* 15: 647-656
- Roth (2013): Carl Roth GmbH + Co. KG: Coffein wasserfrei $\geq 98,5\%$, für die Biochemie. Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Karlsruhe: 14.08.2013
- Sacks, L.E.; Thompson, P.A. (1978): Clear, Defined Medium for the Sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (2): 405-410
- Sakamoto, M.K.; Mima, S.; Kihara, T.; Matsuo, T.; Yasuda, Y.; Tanimura, T. (1993): Developmental Toxicity of Caffeine in the Larvae of *Xenopus laevis*. *Teratology* 47: 189-201
- Sarma, Y.S.R.K.; Chaudhary, B.R. (1977): Effect of chloral hydrate, maleic hydrazide & theobromine on *Sphaeroplea annulina*. *Indian J. Exp. Biol.* 15 (10): 936-939
- Sarma, Y.S.R.K.; Tripathi, S. N. (1976): Effects of chemicals on some members of indian charophyta I. *Caryologia* 29 (3): 247-262
- Sarma, Y.S.R.K.; Shyam, R. (1975): Effect of colchicine, maleic hydrazide, caffeine & theobromine on cell division of the algal flagellate *Gymnodinium inversum* var. *elongatum* Nygaard (Dinophyceae). *Indian J. Exper. Biol.* 13: 387-392
- Schaarschmidt, C. (2008): Theobromin – Zur Geschichte und Gegenwart eines Wirkstoffs. Dissertation. München
- Selderslaghs, I.W.; van Rompay, A.R.; de Coen, W.; Witters, H.E. (2009): Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reprod Toxicol.* 28 (3): 308-320
- Selderslaghs, I.W.; Blust, R.; Witters, H.E. (2012): Feasibility Study of the Zebrafish Assay as an Alternative Method to Screen for Developmental Toxicity and Embryotoxicity Using a Training Set of 27 Compounds. *Reprod. Toxicol.* 33: 142-154
- Smith, G.R.; Burgett, A.A. (2005): Effects of three organic wastewater contaminants on American toad, *Bufo americanus*, tadpoles. *Ecotoxicol.* 14: 477-482
- Sharpe, R.M.; Skakkebaek, N.E. (1993): Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341 (8857): 1392-1395
- Singh, R.N.; Subbaramaiah, K. (1970): Effects of chemicals on *Fischerella muscicola* (Thuret) Gom. *Can. J. Microbiol.* 16 (3): 193-199
- Skopiński, P.; Zukowska, M.; Małkowska-Zwierz, W.; Radomska, D.; Retelska, D.; Kecik, D.; Domosławski, M.; Sobczyńska, A.; Pawińska, M.; Skopińska-Rózewska, E. (1993): The effect of TPP, theophylline and

- theobromine on the angiogenic activity of mononuclear leucocytes obtained from diabetic patients with proliferative retinopathy. *Acta Pol. Pharm.* 50 (4-5): 409-11
- Skopiński, P.; Skopińska-Rózewska, E.; Sommer, E.; Chorostowska-Wynimko, J.; Rogala, E.; Cendrowska, I.; Chrystowska, D.; Filewska, M.; Bialas-Chromiec, B.; Bany, J. (2003): Chocolate Feeding of Pregnant Mice Influences Lengths of Limbs of Their Progeny. *Polish J. Vet. Sci.* 6 (3) Supplement: 57-59
- Slattery, M.L.; West, D.W. (1993): Smoking, alcohol, coffee, tea, caffeine, and theobromine: risk of prostate cancer in Utah (United States). *Cancer Causes Control* 4 (6): 559-563
- Smit, H.J.; Gaffan, E.A.; Rogers, P.J. (2004): Methylxanthines Are the Psycho-pharmacologically Active Constituents of Chocolate. *Psychopharmacol.* 176: 412-419
- Smit, H.J. (2011): Theobromine and the Pharmacology of Cocoa. In: Fredholm, B.B. (Hrsg.): *Handbook of Experimental Pharmacology* 200: 201-234. Springer. Berlin Heidelberg 2011
- Soellner, D.E.; Grandys, T.; Nuñez, J.L. (2009): Chronic Prenatal Caffeine Exposure Impairs Novel Object Recognition and Radial Arm Maze Behaviors in Adult Rats. *Behav. Brain Res.* 205 (1): 191-199
- Soffiatti, M.G.; Nebbia, C.; Valenza, F.; Amedeo, S.; Re, G. (1989): Toxic Effects of Theobromine on Mature and Immature Male Rabbits. *J. Comp. Pathol.* 100 (1): 47-58
- Stavric, B. (1988): Methylxanthines: Toxicity to humans. 3. Theobromine, paraxanthine and the combined effects of methylxanthines. *Food Chem. Toxicol.* 26 (8): 725-733
- Tarka, S.M., Jr.; Zoumas, B.L.; Gans, J.H. (1981): Effects of continuous administration of dietary theobromine on rat testicular weight and morphology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 58 (1): 76-82
- Tarka, S.M., Jr. (1982): The Toxicology of Cocoa and Methylxanthines. A Review of the Literature. *Crit. Rev. Toxicol.* 9 (4): 275-312
- Tarka, S.M., Jr.; Applebaum, R.S.; Borzelleca, J.F. (1986a): Evaluation of the perinatal, postnatal and teratogenic effects of cocoa powder and theobromine in Sprague-Dawley/CD rats. *Food Chem. Toxicol.* 24 (5): 375-382
- Tarka, S.M., Jr.; Applebaum, R.S.; Borzelleca, J.F. (1986b): Evaluation of the teratogenic potential of cocoa powder and theobromine in New Zealand White rabbits. *Food Chem. Toxicol.* 24 (5): 363-374
- Teixidó, E.; Piqué, E.; Gómez-Catalán, J.; Llobet, J.M. (2013): Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicol. in Vitro* 27 (1): 469-478
- TGD-EQS (2011): Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards. Guidance Document No. 27. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC) Technical Report-2011-55, S. 1-203
- Trental 2013: TRENTAL (pentoxifylline) tablet, film coated, extended release [Sanofi-Aventis U.S. LLC]. <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=7977516c-15bf-4fa5-8772-59c6efbe3dc5>. Stand Dezember 2013
- Triche, E.W.; Grosso, L.M.; Belanger, K.; Darefsky, A.S.; Benowitz, N.L.; Bracken, M.B. (2008): Chocolate Consumption in Pregnancy and Reduced Likelihood of Preeclampsia. *Epidemiology* 19 (3): 459-464
- UBA (2003): Umweltbundesamt: Maßnahmewerte (MW) für Stoffe im Trinkwasser während befristeter Grenzwert-Überschreitungen gem.§ 9 Abs. 6-8 TrinkwV 2001. Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission des Bundesministeriums für Gesundheit und soziale Sicherung beim Umweltbundesamt (2003). *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz* 46: 707-710
- UBA 2014: Umweltbundesamt Berlin: Rigoletto. Katalog wassergefährdender Stoffe. <http://webriigoletto.uba.de/rigoletto/public/search.do>. Stand August 2014
- Usmani, O.S.; Belvisi, M.G.; Patel, H.J.; Crispino, N.; Birrell, M.A.; Korbonits, M.; Korbonits, D.; Barnes, P.J. (2005): Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough. *FASEB J.* 19: 231-233

- Wang, Y.; Waller, D.P.; Hikim, A.P.; Russell, L.D. (1992): Reproductive Toxicity of Theobromine and Cocoa-Extract in Male Rats. *Reprod. Toxicol.* 6 (4): 347-353
- Wang, Y.; Waller, D.P.: Theobromine Toxicity of and Cocoa-Extract in Male Rats (1994). *Toxicol. Lett.* 70 (2): 155-164
- WHO (1991/97): World Health Organization (WHO), International Agency for Research on Cancer (IARC): Theobromine. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 51 (1991). Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal. S. 421-441.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol51/mono51.pdf>.
Summary of Data Reported and Evaluation. Letzte Aktualisierung 1997.
- WIKIPEDIA Coffein (2013): WIKIPEDIA, Die freie Enzyklopädie: Coffein. <http://de.wikipedia.org/wiki/Coffein>. Stand Dezember 2013
- WIKIPEDIA Theobromin (2013): WIKIPEDIA, Die freie Enzyklopädie: Theobromin. <http://de.wikipedia.org/wiki/Theobromin>. Stand September 2013
- Woziwodzka, A.; Gwizdek-Wiśniewska, A.; Piosik, J. (2011): Caffeine, pentoxifylline and theophylline form stacking complexes with IQ-type heterocyclic aromatic amines. *Bioorg. Chem.* 39 (1): 10-17
- Wright, G.A.; Baker, D.D.; Palmer, M.J.; Stabler, D.; Mustard, J.A.; Power, E.F.; Borland, A.M.; Stevenson, P.C. (2013): Caffeine in floral nectar enhances a pollinator's memory of reward. *Science* 339: 1202–1204