

ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITÁ DI BOLOGNA

---

FACOLTÁ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Corso di Laurea Magistrale in ANALISI E GESTIONE DELL'AMBIENTE

**“Valutazione del rischio ecologico di residui di farmaci  
nell'ambiente: analisi sperimentale della tossicit  sul crostaceo  
*Daphnia magna*”**

Tesi di laurea in Metodi Ecologici per l'Analisi e la Gestione dell'Ambiente

Relatore

**Prof. Andrea Pasteris**

Presentata da

**Valentina Stignani**

Correlatori

**Prof.essa Elena Fabbri**

**Dott.ssa Valentina Varano**

III sessione

---

Anno Accademico 2011/2012



# SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 I farmaci come inquinanti emergenti	1
1.1.1 Valutazione del rischio ambientale	8
1.1.2 Gestione del rischio ambientale	11
1.2 Farmaci oggetto dello studio	14
1.2.1 Propranololo	15
1.2.2 Fluoxetina	17
1.3 La tossicità delle miscele	18
1.4 <i>Daphnia magna</i> Straus, 1820	27
1.4.1 Morfologia	27
1.4.2 Ciclo vitale e sviluppo	28
1.4.3 Alimentazione	30
1.4.4 Comportamento	30
1.4.5 Habitat	31
1.4.6 Modulatori fisiologici	31
1.4.7 Perché studiare <i>Daphnia magna</i> ?	32
1.4.8 Vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di <i>Daphnia magna</i>	33
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>36</b>
3.1 Allevamenti	36
3.2 Test acuto su tossico di riferimento (dicromato di potassio)	38
3.3 Test per la determinazione del regime alimentare	39
3.3.1 Determinazione del carbonio organico totale	41

3.4 Test cronici con singoli farmaci	42
3.5 Test cronici con miscele di farmaci	44
3.6 Analisi dati	46
3.6.1 Test con singole sostanze	46
3.6.2 Test cronici con miscele di farmaci	47
<b>4. RISULTATI</b>	<b>48</b>
4.1 Test acuto su tossico di riferimento (dicromato di potassio)	48
4.2 Test per la determinazione del regime alimentare	49
4.3 Determinazione del carbonio organico totale	50
4.4 Test cronici con singoli farmaci	52
4.4.1 Test cronico con propranololo	52
4.4.2 Test cronico con fluoxetina	54
4.5 Test cronici con miscele di farmaci	57
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSIONE</b>	<b>75</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 I farmaci come inquinanti emergenti

I farmaci, oltre a essere agenti per la terapia e la prevenzione delle malattie che conosciamo, sono anche degli inquinanti ambientali ubiquitari che contaminano l'ambiente attraverso una miriade di fonti di inquinamento. Il riconoscimento di questa nuova problematica ambientale sulla base dei dati di presenza raccolti (Tabella 1.1) ha dato il via ad una serie di studi, pionieristici negli anni Ottanta e specifici e sistematici alla fine degli anni Novanta, per stabilire quanto il problema sia diffuso, quali le sue dimensioni e quali le possibili implicazioni per l'ambiente e la salute umana (Zuccato et al., 2007).

**Tabella 1.1 Il riconoscimento del problema ambientale: i principali farmaci che si ritrovano nelle acque di fiumi e laghi in Europa (Heberer et al., 2002).**

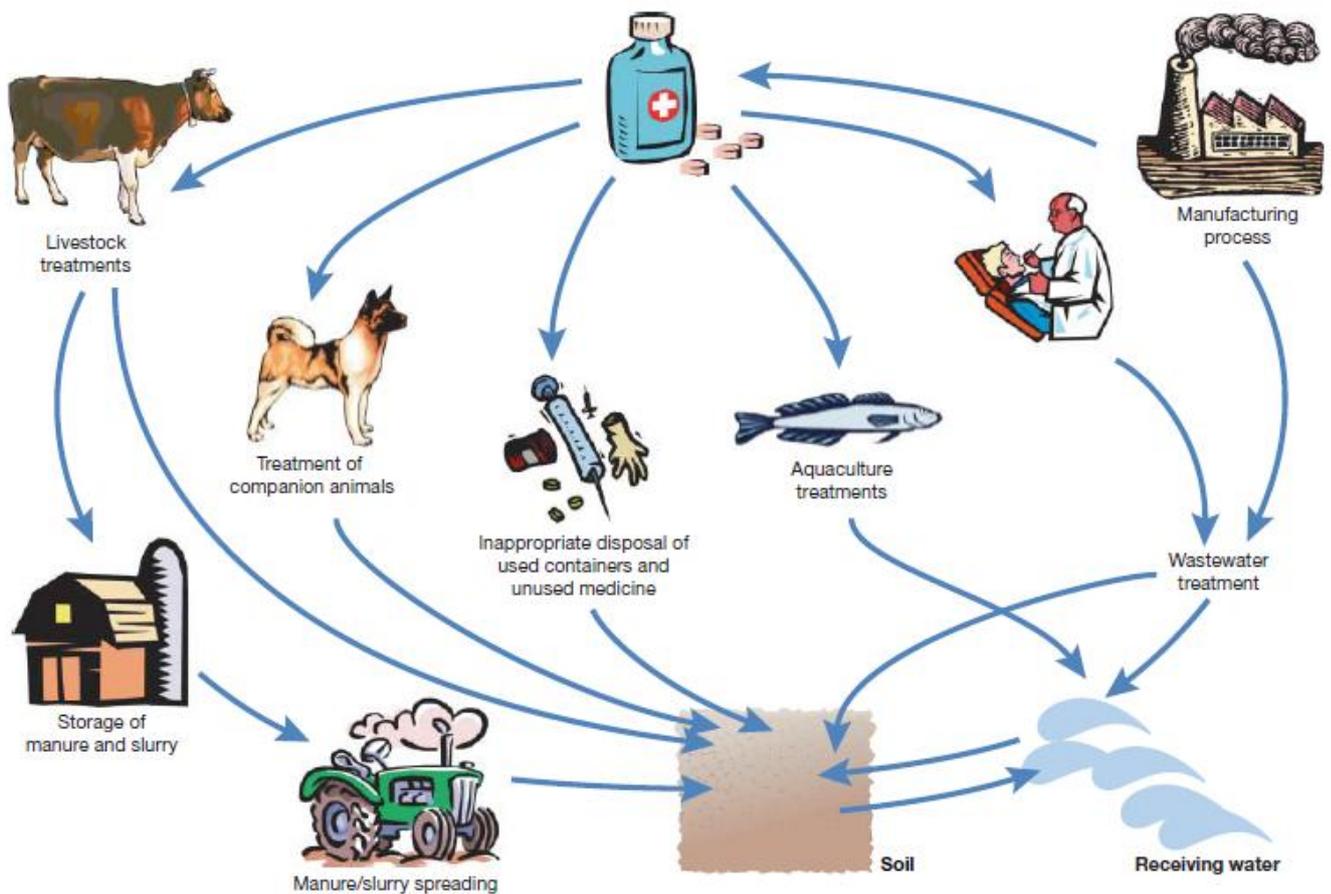
<i>Penicilline</i>	Amoxicillin
<i>Tetraciclina</i>	Tetracycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline
<i>Chinoloni</i>	Ciprofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Enrofloxacin
<i>Macrolidi-lincosamidi</i>	Clarithromycin, Erythromycin, Dehydro-erythromycin, Lincomycin, Spiramycin, Roxithromicin
<i>Sulfonamidi</i>	Sulphamethoxazole, Sulphadimethoxine, Sulphamethazine, Sulphathiazole
<i>Anti-infiammatori, Analgesici</i>	Ibuprofen, Paracetamol, ASA, Diclofenac, 4-Aminoantipyrine, Aminophenazone, Codeine, Fenoprofen, Hydrocortone, Indometacine, Ketoprofen, Mefenamic acid, Naproxen, Phenazone, Propyphenazone
<i>Cardiovascolari</i>	Atenolol, Metoprolol, Propanolol, Betaxolol, Bisoprolol, Nadolol, Sotalol, Enalapril, Enalaprilat, Nifedipine, Diltiazem
<i>Ipolipemizzanti</i>	Bezafibrate, Clofibrac acid, Gemfibrozil, Fenofibrac acid
<i>Diuretici</i>	Furosemide, Hydrochlorothiazide
<i>Antidiabetici</i>	Glibenclamide, Metformin, Chlorpropamide
<i>Gastrointestinali</i>	Omeprazole, Ranitidine, Cimetidine
<i>Farmaci per il SNC</i>	Carbamazepine, Primidone, Diazepam, Fluoxetine, Pentobarbital, Phensuximide
<i>Broncodilatatori</i>	Salbutamol, Terbutaline, Clenbuterol, Fenoterol
<i>Estrogeni, Ormoni</i>	Ethinylestradiol, Mestranol
<i>Antitumorali</i>	Cyclophosphamide, Ifosfamide
<i>Farmaci veterinari</i>	Oleandomycin, Oxytetracycline, Tilmicosin, Tylosin, Chloramphenicol
<i>Vari</i>	Trimethoprim, Pheneturide, Pentoxifylline
<i>Mezzi di contrasto</i>	Diatrizoate, Iohexol, Iopamidol, Iomeprol, Iothalamic acid, Ioxithalamic acid, Amidotrizoic acid, Gadolinium organic complexes

I farmaci vengono definiti, insieme ad altri tipi di sostanze, dal NORMAN network (network di laboratori, centri di ricerca e organizzazioni per il monitoraggio e il biomonitoraggio delle nuove sostanze ambientali coordinato dalla Commissione Europea) come “inquinanti emergenti” cioè sostanze inquinanti che attualmente non sono inserite nei programmi di monitoraggio di routine a livello europeo ma che possono essere candidati per la normativa futura a seconda della loro ecotossicità, gli effetti sulla salute, la percezione del pubblico, e sui dati relativi alla loro presenza nei diversi comparti ambientali.

Purtroppo non esistono dati disponibili riguardo l'uso totale mondiale dei farmaci, infatti il consumo e l'impiego dei farmaci possono variare considerevolmente da paese a paese (Verbrugh and de Neeling, 2003; Goossens et al., 2007; Schuster et al., 2008). Nell'Unione Europea circa 3000 differenti sostanze vengono utilizzate nella medicina come i farmaci analgesici e antinfiammatori, contraccettivi, antibiotici, beta-bloccanti, lipidi regolatori, composti neuro attivi e molti altri (Fent et al., 2006). In Inghilterra, Germania, e Australia l'ammontare dei farmaci più frequentemente usati è di centinaia di tonnellate per anno (Jones et al., 2002; Huschek et al., 2004; Khan and Ongerth, 2004). Nel 2005 negli Stati Uniti, sono fatte 214.030.000 prescrizioni di medicinali contenenti fluoxetina tanto che quell'anno la fluoxetina è stato il ventinovesimo farmaco più prescritto (Stanley et al., 2007).

I farmaci più comunemente rilevati sono, in genere, quelli maggiormente usati in quantitativi elevati, ma con molte eccezioni. Vi sono farmaci utilizzati in notevoli quantitativi che non si ritrovano nell'ambiente perché rapidamente degradati; ve ne sono altri usati in quantitativi non così elevati, che si ritrovano in concentrazioni elevate perché sono estremamente persistenti (Zuccato et al., 2007). Le aspettative sono che le quantità di farmaci inquinanti continueranno ad aumentare a causa del miglioramento delle cure sanitarie. Quindi l'inquinamento da farmaci risulta essere un inquinamento diffuso, di natura antropogenica, strettamente legato alla presenza umana (Heberer, 2002; Zuccato et al., 2000). È quindi importante identificare quali siano le fonti antropogeniche principali per poter analizzare a fondo questo tipo di inquinamento (Figura 1.1). I prodotti farmaceutici, tal quale o come metaboliti, giungono nei vari compartimenti ambientali tramite diversi percorsi quali la produzione dei farmaci stessi (processi di pulizia dell'industria produttrice), consumo domestico o negli ospedali, smaltimento improprio, dagli effluenti delle acque reflue,

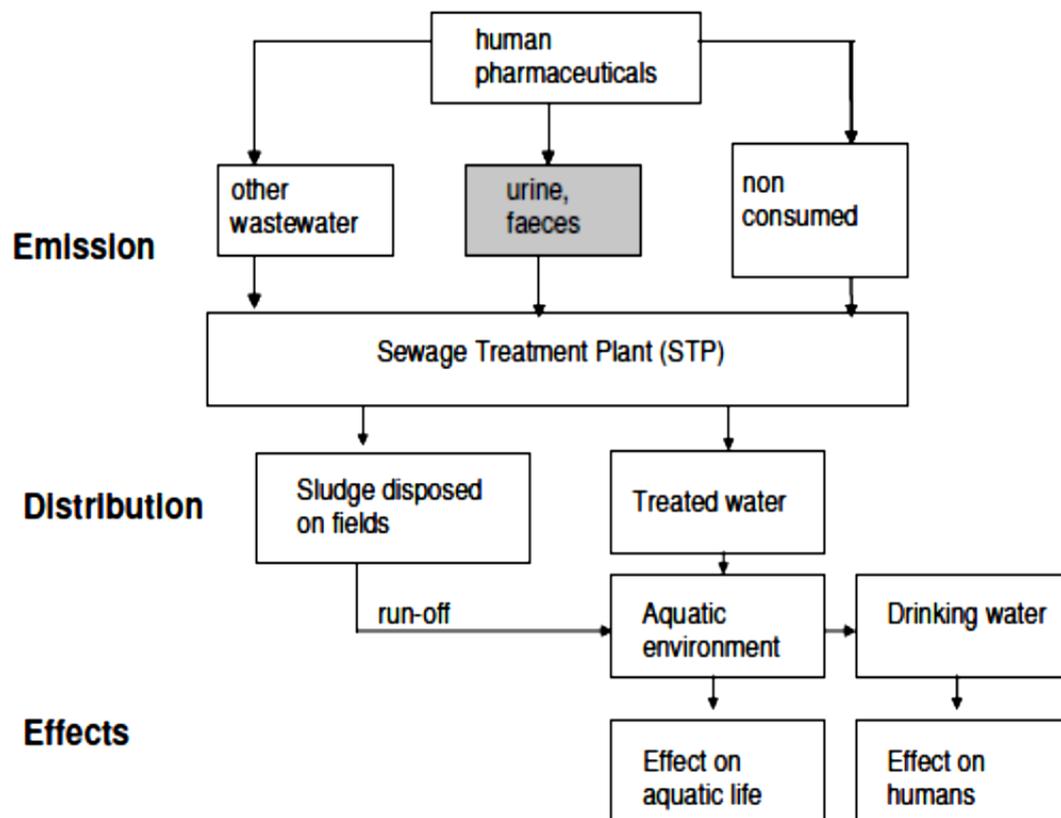
attraverso l'applicazione diretta nell'acquacoltura o indiretta tramite l'utilizzo del concime di animali trattati con farmaci veterinari e il conseguente deflusso.



**Figura 1.1** Modalità con cui i farmaci entrano in ambiente (Boxall, 2004).

La principale fonte è comunque l'ingestione umana seguita dalla deiezione e lo smaltimento tramite gli scarichi (Fent et al., 2006). Infatti i farmaci, una volta somministrati all'uomo, vengono escreti dal corpo con urine e feci come composti tal quali o come metaboliti, ossia molecole che risultano da variazioni della loro struttura chimica all'interno del corpo o sulla pelle delle persone trattate o degli animali (Längin et al., 2008). In seguito l'insieme delle acque reflue giunge nella rete fognaria e infine negli impianti di trattamento delle acque reflue (STP, *sewage treatment plant*). Negli impianti attuali, che utilizzano principalmente trattamenti primari (fisici) e secondari (biologici), i prodotti farmaceutici non sono facilmente

degradati, così che gli effluenti finali trattati contaminano i corpi ricettori come i fiumi, laghi, estuari e raramente anche le falde sotterranee e quindi l'acqua potabile (Figura 1.2).



**Figura 1.2. Il percorso dei farmaci nell'ambiente: l'ingestione umana come fonte principale (www.switchtraining.eu).**

I farmaci sono generalmente sostanze caratterizzate da una bassa volatilità e si distribuiscono nell'ambiente primariamente attraverso trasporto acquoso, ma anche disperdendosi attraverso la catena alimentare. Il loro comportamento e il destino dei loro metaboliti nell'ambiente acquatico non è ben conosciuto (Fent et. al 2006). Rispetto agli altri inquinanti presenti nelle acque, i farmaci sono molecole con elevata attività biologica su organismi diversi, inoltre le loro proprietà fisico-chimiche possono limitare la loro persistenza nell'ambiente. I parametri fisico-chimici come il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ( $K_{ow}$ ) e la costante di dissociazione sono valori di grande importanza per i modelli ambientali che descrivono il destino delle sostanze nell'ambiente acquatico, e per valutare la distribuzione nel suolo, biomassa, sedimento e colonna d'acqua. Inoltre forniscono informazioni sulla matrice che può detenere in prevalenza i composti degradati e non nell'ambiente. Molti farmaci hanno, inoltre, un comportamento come acidi o basi

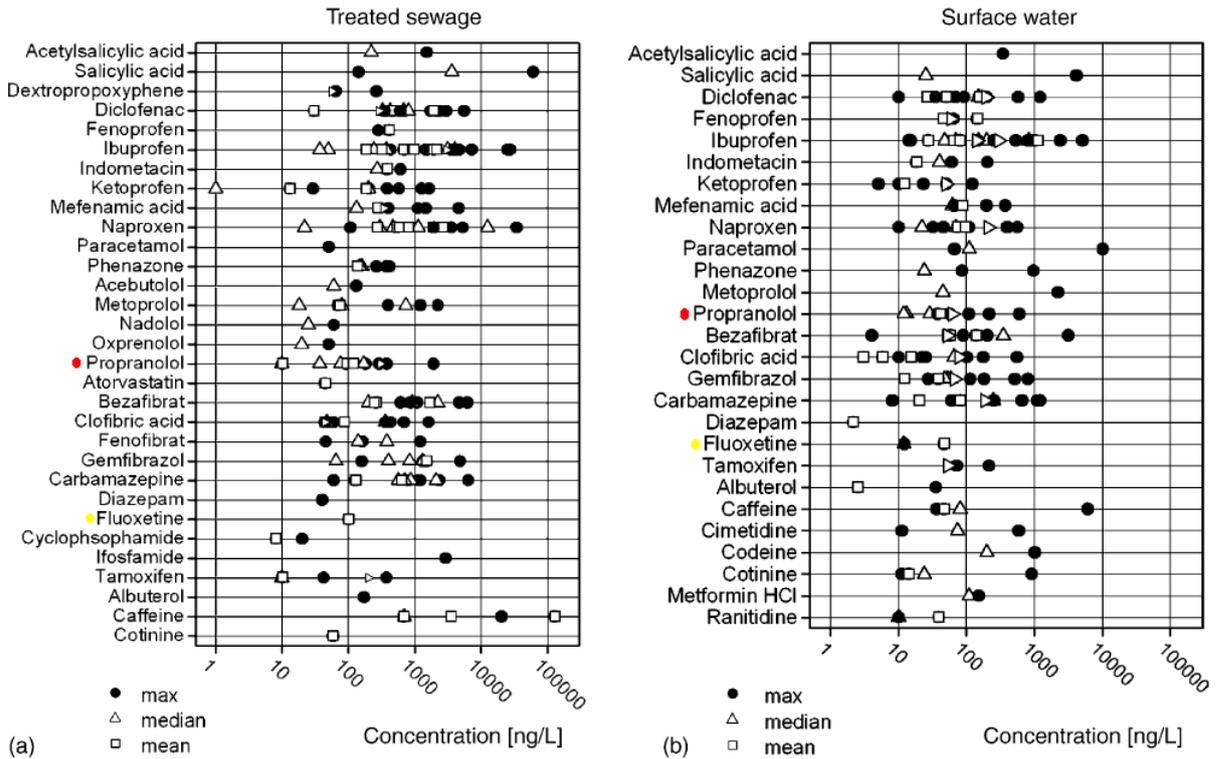
deboli, quindi la loro distribuzione dipende dal pH del mezzo e dalla costante di acidità ( $K_a$ ) o basicità ( $K_b$ ) che determina la loro ionizzazione nel mezzo. Generalmente, i principi attivi acidi non si dissociano facilmente in pH acidi, e a causa della loro affinità per i lipidi passano attraverso le membrane biologiche aumentando il bioaccumulo nel biota (Kümmerer, 2008). Risulta chiaro che le proprietà fisico-chimiche e la varietà strutturale dei farmaci determina la loro distribuzione nell'ambiente, e i loro relativi problemi di bioaccumulo e biomagnificazione nella catena alimentare (Narvaez et al., 2012).

Invece, indipendentemente dalle caratteristiche chimiche del composto, l'efficienza dei vari tipi di impianti di trattamento delle acque può anche variare per lo stesso composto sia per le caratteristiche tecnologiche, ma anche per altri fattori come la temperatura e le stagioni (Fent et al., 2006), l'intensità della luce e le caratteristiche dell'influyente (Carballa et al., 2004; O'Brien et al., 2004).

La presenza di alcuni farmaci negli effluenti negli STP è stata confermata in Germania (Ternes, 1998; Hirsch et al., 1999), nei Paesi Bassi (Belfroid et al., 1999), in Svizzera (Golet et al., 2001), in Gran Bretagna (Johnson et al., 2001), Francia, Grecia, Svezia, Italia (Andreozzi et al., 2003), Spagna (Carballa et al., 2004), Stati Uniti (Huggett et al., 2003), Canada (Metcalf et al., 2003), Brasile (Stumpf et al., 1999), e Australia (Braga et al., 2005).

La presenza dei farmaci nell'ambiente acquatico dimostra quantomeno la loro incompleta degradazione ed eliminazione nel trattamento delle acque reflue (Kümmerer et al., 2009). In particolare negli effluenti degli STP differenti farmaci si presentano generalmente con concentrazioni che vanno dall'ordine di grandezza dei ng/L a quello dei  $\mu\text{g/L}$ , mentre nei fiumi, laghi e acque marine sono state rilevati range dell'ordine di grandezza dei ng/L (Buser et al., 1998; Kolpin et al., 2002; Weigel et al., 2002; Thomas and Hilton, 2004). Alcune acque potabili (Heberer and Stan, 1996; Stumpf et al., 1999; Zuccato et al., 2000; Stackelberg et al., 2004), falde (Holm et al., 1995; Ternes et al., 2001), e percolati di discarica (Holm et al., 1995) contengono farmaci con range di concentrazione dell'ordine di grandezza dei ng/L, e in alcuni casi al di sopra dei  $\mu\text{g/L}$ .

Nella figura 1.3 sono rappresentate le concentrazioni di alcuni farmaci sia nelle acque trattate che nelle acque superficiali, in particolare si evidenziano quelle del propranololo (simbolo in rosso) e quella della fluoxetina (simbolo in giallo):



**Figura 1.3. Concentrazione dei farmaci nelle acque trattate (a) e nelle acque superficiali (b) (Fent et al., 2006).**

Nella tabella seguente sono riportati i valori di concentrazione dei farmaci oggetto dello studio che sono stati riscontrati in letteratura (Tabella 1.2):

**Tabella 1.2 Concentrazioni espresse in ng/L di propranololo e fluoxetina come riportati in letteratura.**

	Concentrazione nelle acque superficiali ng/L	Concentrazione degli effluenti (STP) ng/L	Riferimenti
<b>Propranololo</b>	590	290	Ternes (1998)
	100	300	ENDS (2005)
		10-40	Ferrari et al. (2004)
	<10-37	130-180	Hilton et al. (2003)
		1900	Huggett et al. (2002)
		6500 (ospedali)	Santos et al.(2010)
<b>Fluoxetina</b>	12		Kolpin et al.(2002)
		13-46	Metcalfe et al. (2003)
		320-540	Weston et al. (2001)
	5,5		Vanderford et al. (2003)

Le concentrazioni rilevate nelle acque determinano una serie di effetti biologici non ancora del tutto chiari. I farmaci sono progettati per target specifici utilizzando specifiche vie metaboliche e molecolari nell'uomo e negli animali, ma possono avere anche effetti collaterali importanti. Una volta introdotti in ambiente essi possono agire attraverso le stesse vie negli organismi acquatici che possiedono identici o simili organi bersaglio, tessuti, cellule o biomolecole. Infatti alcuni recettori in organismi sistematicamente molto lontani possono assomigliare a quelli dell'uomo, altri invece possono essere diversi o addirittura essere assenti. Per questo è fondamentale conoscere in modo specifico le modalità d'azione dei farmaci, anche se questo spesso non è sempre possibile, infatti una singola sostanza può avere più modalità d'azione.

Grazie ai saggi di tossicità con animali acquatici è possibile valutare se un dato composto, una miscela di composti o un campione d'acqua di scarico sono tossici e, in caso positivo, definire il grado di tossicità o i valori di diluizione compatibili con la vita acquatica (IRSA, 1999). Secondo Fent et al. (2006) le specie per svolgere test ecotossicologici sui farmaci andrebbero scelte tra quelle in cui è nota la presenza di target specifici per il farmaco da saggiare. Invece la prassi corrente è quella di adottare le stesse specie e metodi standard utilizzati per valutare la tossicità dei contaminanti "tradizionali", per cui sono disponibili protocolli standardizzati.

In particolare i test effettuati possono essere acuti o cronici, rispettivamente di breve o di lunga durata rispetto alla lunghezza del ciclo vitale dell'organismo. Gli effetti cronici sono meno studiati rispetto a quelli acuti, ma studi sulle esposizioni a lungo termine sono necessarie per una valutazione accurata del rischio ambientale soprattutto di fronte alle concentrazioni ambientali rilevate dagli studi presenti in letteratura. Infatti le concentrazioni ambientali misurate sono molto inferiori a quelle che esercitano effetti tossici acuti sull'uomo, e non va sottovalutato il fatto che tramite l'acqua e la catena alimentare si possa verificare un'esposizione continua degli organismi ai farmaci (Zuccato et al., 2004). Precisamente i test di tossicità cronica sono studi nei quali gli organismi sono esposti a differenti concentrazioni di sostanze da testare per un lungo periodo che può comprendere una parte sostanziale del loro ciclo di vita. Inoltre rispetto ai test acuti che spesso usano la mortalità come unica misura dell'effetto, i test cronici possono includere più endpoints come la crescita o la riproduzione degli organismi.

È comune nei test ecotossicologici la valutazione degli effetti di una singola sostanza, ma nei tempi recenti, volendosi sempre più ad avvicinare alla valutazione degli effetti reali nell'ambiente, si è sempre più cercato di effettuare test con miscele di farmaci anche di fronte al fatto evidente che gli effetti delle miscele non sono sempre la somma dei singoli effetti dei composti che la formano. Di conseguenza, visto che il rilascio dei farmaci nell'ambiente acquatico avviene in modo permanente e solitamente in forma di miscela, un'accurata previsione della tossicità di miscele croniche è indispensabile per la valutazione e gestione del rischio ambientale (Kümmerer et al., 2009).

### 1.1.1 Valutazione del rischio ambientale

Gli aspetti di tipo ambientali riguardanti i farmaci sono stati affrontati in Europa per la prima volta nel 1993 con la direttiva 93/39/CEE che introduceva la necessità di segnalare ogni possibile rischio ambientale potenzialmente correlato all'utilizzo dei prodotti medicinali. Successivamente l'EMA, l'Agenzia europea per la valutazione dei farmaci, introduceva il principio della valutazione del rischio ambientale per tutti i nuovi farmaci prima di provvedere alla loro registrazione. Nel 1997 vennero pubblicate le prime linee guida per la valutazione del rischio ambientale dei farmaci per uso veterinario e, finalmente, nel 2001 ci fu la pubblicazione delle linee guida per la valutazione del rischio ambientale dei farmaci per uso umano. Secondo le linee guida le domande di autorizzazione alla messa in commercio dei prodotti farmaceutici per uso umano devono essere accompagnate dalla valutazione del rischio ambientale (ERA). Ossia vi è l'obbligo di una valutazione del rischio ambientale per i nuovi prodotti medicinali per cui si richiede l'autorizzazione alla commercializzazione all'interno dell'Unione Europea. Le linee guida prevedono una struttura a più livelli che permette complessivamente di prendere una decisione basata sui dati disponibili, cosiddetta "step-wise", sul rischio ambientale correlato al farmaco in esame. Ciascun livello permette di stabilire se per il farmaco in oggetto può essere escluso un rischio ambientale, nel qual caso l'indagine può essere interrotta, oppure se tale rischio non può essere escluso, prevedendo allora il passaggio al livello successivo (Zuccato et al., 2007).

Nella tabella 1.3 sono illustrate le due fasi della valutazione del rischio per i farmaci ad uso umano: la fase I stima l'esposizione dell'ambiente al farmaco in esame; nella fase II, divisa

ulteriormente in due sottofasi, sono ottenute e valutate le informazioni sul destino e gli effetti nell'ambiente del farmaco.

**Tabella 1.3 L'approccio per fasi nella valutazione del rischio ambientale dei farmaci ad uso umano (EMEA, 2006).**

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

Come illustrato nella tabella 1.3 nella fase I si richiede la valutazione del logK<sub>ow</sub> della sostanza in esame. Se questo risulta maggiore di 4,5 sono necessarie valutazioni di persistenza, bioaccumulo e tossicità. La seconda richiesta all'interno di questa di questa fase è il calcolo del PEC (Predicted Environmental Concentration) nelle acque superficiali. Se questa presenta valori minori di 0,01 µg/L il farmaco non rappresenta un rischio per l'ambiente (tranne alcuni casi limite), se invece presenta valori uguali o maggiori allora il farmaco deve essere sottoposto alla fase II.

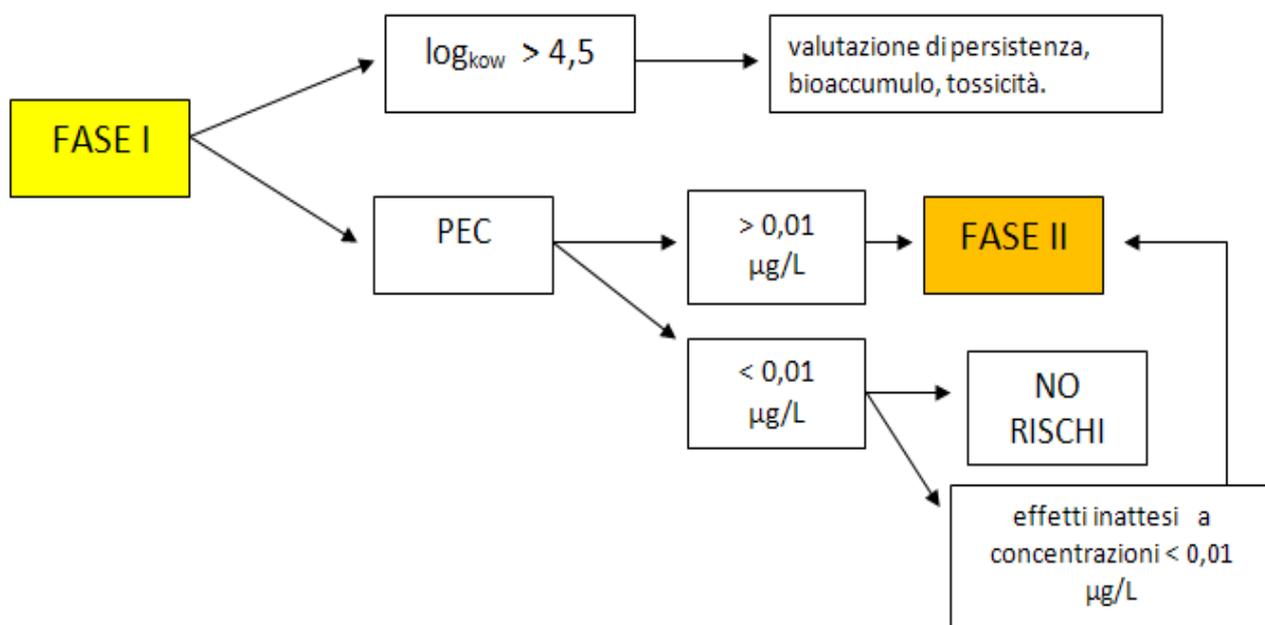
Il primo livello (A) della fase II prevede l'analisi del destino e degli effetti iniziali in ambiente del farmaco. Per questo sono raccolte informazioni sulle proprietà chimiche e fisiche e studi sugli effetti del farmaco nell'ambiente acquatico (Tabella 1.4):

**Tabella 1.4 Studi fisico-chimici, sul destino e gli effetti nell'ambiente raccomandati nella fase II (A) (EMEA, 2006).**

Study Type	Recommended Protocol
Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method	OECD 106/ OECD 121/OPPTS 835.1110*
Ready Biodegradability Test	OECD 301
Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems	OECD 308
Algae, Growth Inhibition Test	OECD 201
<i>Daphnia sp.</i> Reproduction Test	OECD 211
Fish, Early Life Stage Toxicity Test	OECD 210
Activated Sludge, Respiration Inhibition Test	OECD 209

\* One study is generally sufficient.

Le informazioni raccolte permettono di identificare i potenziali rischi per l'ambiente. Se questi sono effettivamente individuati si rende necessario passare al secondo livello (B) della fase II dove sono effettuati ulteriori approfondimenti, altrimenti significa che il farmaco non rappresenta un rischio per l'ambiente (Figura 1.4).



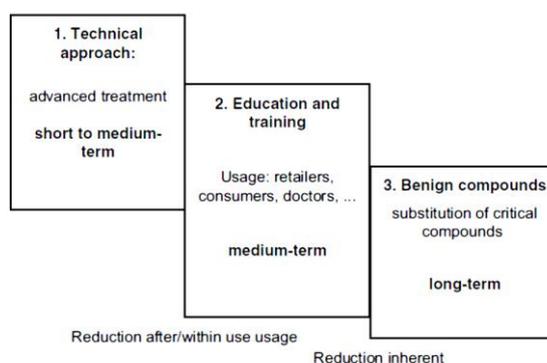
**Figura 1.4 Linee guida per l'analisi del rischio ambientale per farmaci ad uso umano.**

Una volta effettuata l'indagine e verificato che non si possa escludere un rischio per l'ambiente correlato con il farmaco in esame (sostanza attiva e/o metaboliti), allora è necessario adottare una serie di misure di precauzione e sicurezza con lo scopo di mitigare il

più possibile l'esposizione dell'ambiente al nuovo farmaco. Queste possono essere le etichettature speciali che indicano i potenziali rischi ambientali, ma che vengono anche riportate nel foglietto illustrativo del medicinale insieme alle indicazioni sullo stoccaggio, la somministrazione e smaltimento (restituzione in farmacia). Quest'ultimo soprattutto per i farmaci riconosciuti come pericolosi, anche perché in nessun caso un farmaco ritenuto pericoloso per l'ambiente verrà eliminato, ma saranno attivate solo misure indirette per mitigare il rischio ambientale. Invece per i farmaci già in commercio non è stato ancora previsto nulla nel regolamento.

### 1.1.2 Gestione del rischio ambientale

La consapevolezza della presenza dei prodotti farmaceutici nell'ambiente, accoppiata con evidenza agli effetti, suggerisce la necessità di considerare le azioni di gestione precauzionale per ridurre il rilascio dei farmaci in ambiente. L'ingresso nei vari compartimenti può essere ridotto sfruttando approcci diversi, ossia combinazione di strategie che permettano una più efficace mitigazione dei rischi. Esaminandole da un punto di vista temporale queste possono essere tre: un approccio di tipo tecnico, quindi trattamenti delle acque di tipo avanzato (da breve a medio termine); educazione e formazione, ossia le modalità d'uso da parte dei rivenditori, consumatori, medici (medio termine); e l'uso di composti benevoli tramite la sostituzione dei composti più critici (lungo termine) (Figura. 1.5). Il più discusso è il primo, mentre l'ultimo è quello che sta emergendo sempre più, infatti in termini di stabilità sembra essere il più promettente nel lungo periodo (Kümmerer, 2007).

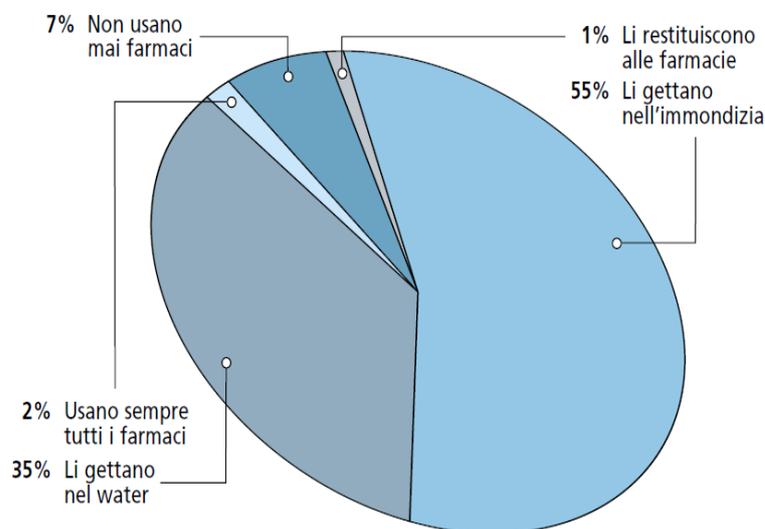


**Figura 1.5 Principali strategie per ridurre gli input dei farmaci nell'ambiente (Kümmerer, 2007).**

Il primo approccio riguarda i depuratori e questi, come già precedentemente detto, non sono in grado di incidere in maniera sostanziale sul carico di inquinanti. Molti farmaci sono rimossi solo in maniera incompleta, e alcuni farmaci, i più persistenti non lo sono per nulla (Castiglioni et al 2006; Golet et al., 2001). Le acque depurate sono quindi ancora ricche di farmaci e si riversano nelle acque superficiali di canali, fiumi e laghi portando con sé questo carico di inquinanti potendo raggiungere anche le acque potabili. È quindi necessaria una maggiore efficienza degli impianti di trattamento delle acque reflue. Un depuratore “classico” è un impianto dotato di due sistemi di depurazione, primario e secondario, che sono rispettivamente di tipo meccanico e biologico. La possibile attenuazione del problema è l’associazione a questi di un sistema di depurazione terziario specificatamente diretto alla rimozione o alla degradazione di inquinanti recalcitranti come i farmaci. I trattamenti di tipo avanzato che sono stati più studiati sono quelli che utilizzano processi come flocculazione, ozonazione, ossidazione avanzata, membrane filtranti (adsorbimento con carbone attivo) e fotocatalisi. Per ognuna di queste tecnologie esistono vantaggi e svantaggi, infatti l’efficienza del tipo di trattamento può dipendere fortemente dal tipo di composto, e nessuna tecnologia può rimuovere tutti i composti (Castiglioni et al., 2006).

La gestione del rischio, perché abbia una corretta ed efficace strategia, necessita di conoscenze specifiche riguardanti le sorgenti. Così è necessario conoscere la dimensione dei flussi di sostanze associate alle diverse fonti di farmaci, quali l’utenza domestica e gli ospedali. Al contrario di quanto ci si aspetterebbe è stato rilevato che gli ospedali sono fonti di minore importanza (Putschew et al., 2007; Joss et al., 2008), quindi trattamenti avanzati delle acque reflue in questo caso non saranno molto efficaci. Tuttavia esiste un altro modo per ridurre il loro contributo, ossia tramite l’istruzione e la formazione del personale e dei pazienti. Ciò non vale solo per gli ospedali, ma può essere una strategia generalizzata, infatti una corretta educazione dei consumatori all’acquisto, all’uso e allo smaltimento appropriato dei farmaci, soprattutto quelli scaduti che andrebbero sempre consegnati in farmacia per essere smaltiti in maniera appropriata, potrebbe portare ad un forte contributo alla riduzione dell’inquinamento. Così come la consapevolezza dei rischi ambientali che può rappresentare un ulteriore motivo per evitare l’abuso di medicinali superflui o inutili (Zuccato et al., 2007). In una recente indagine USA su un campione di 500 consumatori intervistati, è risultato che ben pochi sono coloro che smaltiscono i farmaci scaduti o

inutilizzati in modo appropriato, restituendoli in farmacia. La maggior parte preferisce sbarazzarsene gettandoli nella spazzatura o nelle fognature, contribuendo in questo modo all'inquinamento ambientale (Figura 1.6).



**Figura 1.6** Indagine USA: cosa fanno i consumatori dei farmaci scaduti (n=500) (Kuspis et al., 1996).

La terza strategia d'azione, ma non meno importante è la *"green pharmacy"*. Si basa sui principi della *"green chemistry"* (Anastas and Warner, 1998) che afferma che la funzionalità di una sostanza non dovrebbe solo includere le proprietà chimiche necessarie per la sua applicazione ma anche la facile e veloce degradabilità dopo il suo utilizzo. La *"green pharmacy"* rappresenta il tentativo condotto da alcuni ricercatori di stimolare la nascita di una farmaceutica più ecocompatibile, una farmaceutica che assieme a tutte le altre caratteristiche di un farmaco tenga anche conto dei risvolti ambientali di ciò che produce (Daughton et al., 2003). Questa strategia è stata applicata in Svezia, infatti lo *Stockholm County Council and Apoteket* e lo *Swedish Chemicals Inspectorate* hanno messo a punto un modello per la classificazione dei farmaci in base alle loro caratteristiche ecotossicologiche. Nasce così un libretto in cui tutti i principali farmaci utilizzati in Svezia sono stati classificati in base alla loro azione e, secondariamente, in base ai rischi ambientali correlati al loro utilizzo. La pubblicazione è stata poi distribuita a tutti i medici prescrittori svedesi, con il suggerimento di tener conto, per farmaci di pari attività e costo, anche delle caratteristiche ambientali, e di prescrivere ai propri pazienti quello più ecocompatibile. Questa iniziativa

oltre a sensibilizzare i medici prescrittori sui rischi ambientali, ha lo scopo di allertare l'industria farmaceutica in modo che nella formulazione dei futuri prodotti inizi a mostrare interesse anche verso queste tematiche (Zuccato et al., 2007).

## 1.2 Farmaci oggetto dello studio

I farmaci utilizzati in questo studio sono il propranololo e la fluoxetina. Entrambi questi farmaci hanno un effetto sull'azione della serotonina, anche se con meccanismi diversi. La serotonina o 5-idrossitriptamina (5-HT) è un neurotrasmettitore monoaminico sintetizzato nei neuroni serotonergici nel sistema nervoso centrale, nonché nelle cellule enterocromaffini nell'apparato gastrointestinale, ed è principalmente coinvolta nella regolazione dell'umore. È probabilmente uno dei più potenti e ubiquitari neuromodulatori nei vertebrati (Azmitia, 1999), mentre negli invertebrati svolge un ruolo nella fisiologia e nel comportamento di molti differenti taxa (Stanley et al., 2006), come per esempio l'induzione della deposizione di uova nei bivalvi (Ram et al., 1993), il controllo del movimento di rotazione delle ciglia negli embrioni di gasteropodi (Uhler et al., 2000), e del nuoto negli anellidi (Brodfuehrer et al., 1995). Inoltre è un importante neuromodulatore delle funzioni sessuali sia nei vertebrati che negli invertebrati (Brooks et al., 2003a). Infatti variazioni della concentrazione della serotonina sono correlati con le fasi riproduttive delle donne (Hindberg and Naesh, 1992) e degli animali, incluse le femmine di pesci (Hernandez-Rauda et al., 1999). Nei crostacei, in particolare, la serotonina svolge un ruolo importante nel controllo dell'alimentazione (Ayali and Harris-Warrick, 1999), nella regolazione della frequenza cardiaca (Florey and Rathmayer, 1978), locomozione (Tierney and Mangiamele, 2001; Tierney et al., 2004), battito dei fillopodii (Barthe et al., 1993), postura addominale (Livingstone et al., 1980; Tierney and Mangiamele, 2001; Tierney et al., 2004), fuga (Yeh et al., 1997), e comportamento combattivo (Sosa and Baro, 2002).

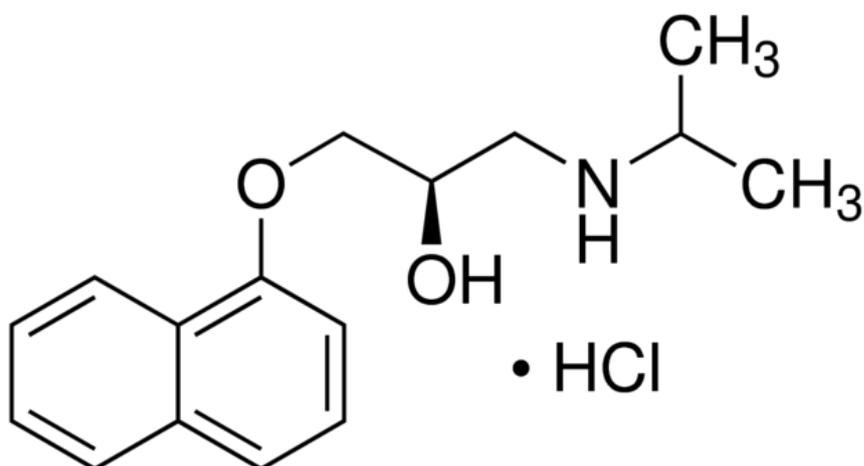
Ad oggi, sette classi di recettori della serotonina con diversi sottotipi sono stati identificati e classificati nei mammiferi rispetto ai loro meccanismi di trasduzione del segnale e proprietà farmacologiche (Gerhardt and van Heerikhuizen, 1997; Kroeze et al., 2002). Anche nel sistema nervoso dei crostacei sono presenti più recettori per la 5-HT ma solo due, 5-HTR<sub>1crust</sub> e 5-HTR<sub>2\_pro</sub> (o 5-HTR<sub>1alpha</sub> e 5-HTR<sub>2beta</sub>), sono stati analizzati in modo più dettagliato e

localizzati nelle strutture del SNC dei gamberi (Sosa et al., 2004; Clark et al., 2004). Questi sono omologhi dei recettori 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2B</sub>, sottotipi del recettore 5-HT<sub>1</sub>, dei vertebrati (Clark et al., 2004; Sosa et al., 2004), ma secondo Tierney (2001), i recettori 5-HT, dal punto di vista farmacologico variano tra i phyla e rispetto ai recettori omologhi degli invertebrati. Almeno tre recettori dei crostacei (5-HT<sub>1β</sub>, 5-HT<sub>2α</sub>, 5-HT<sub>7</sub>) rimangono non caratterizzati (Clark et al., 2004; Tierney, 2001).

### 1.2.1 Propranololo

Il propranololo fu ottenuto grazie ai precursori degli antagonisti dei recettori β-adrenergici dicloroisoprenalina e pronetalolo alla fine degli anni 50 dallo scienziato scozzese James W. Black per il quale ottenne nel 1988 il Premio Nobel per la Medicina. Attualmente è commercializzato come propranololo cloridrato.

Il propranololo (C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>, nome IUPAC: (RS)-1-(1-methylethylamino)-3-(1-naphthyloxy)propan-2-ol) è una molecola chirale che esiste sottoforma di due enantiomeri: (S)-(-)-propranololo e (R)-(+)-propranololo, quest'ultimo è stato utilizzato nel presente studio (Figura 1.7).



**Figura 1.7 Enantiomero (R)-(+)-propranololo**

Ha la caratteristica di essere una sostanza altamente lipofila con un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua log K<sub>ow</sub> che aumenta linearmente da 0,92 a 5,7 per pH tra 6 e 9 (Owen et al., 2009). Infatti riesce a raggiungere alte concentrazioni nei tessuti, e questa

caratteristica, insieme al suo essere un forte stabilizzatore di membrana può in parte spiegare la sua alta tossicità (Huggett et al., 2002).

Appartiene al gruppo dei beta-bloccanti non selettivi, ossia blocca l'azione dell'adrenalina sui recettori adrenergici, legandosi ma non attivandoli,  $\beta_1$  (nel cuore) e  $\beta_2$  (recettori situati nel cuore, bronchi, vasi sanguigni, stomaco, intestino, utero). Di conseguenza viene ridotta la gittata cardiaca e la pressione arteriosa, in pratica il lavoro del muscolo cardiaco. Si è anche osservato che il propranololo ha un effetto inibitorio sul trasportatore della noradrenalina e ne stimola il rilascio.

Il propranololo, inoltre, ha attività antagonista per i recettori della serotonina (Alexander and Wood 1987) e quest'ultima, come già affermato, influenza la fisiologia degli invertebrati a vari livelli (Tierney, 2001). In particolare il propranololo nei vertebrati si può legare come antagonista al recettore della serotonina 5-HT<sub>1</sub> (Tierney 2001) agendo su questi recettori in modo stereoselettivo, con l'(S)-propranololo il più potente enantiomero (Alexander and Wood, 1987).

All'uomo è prescritto come farmaco nei casi di ipertensione, angina, tachiaritmie, extrasistoli, infarto miocardico acuto, cardiomiopatia ipertrofica, tireotossicosi, tremore essenziale, tetralogia di Fallot, glaucoma, profilassi dell'emigrania e della cefalea a grappolo. Il farmaco è stato, ed è, sperimentato anche in campo psichiatrico per trattare l'assunzione eccessiva di liquidi nella polidipsia psicogena, il comportamento aggressivo di pazienti con danni cerebrali, e il disturbo post traumatico da stress. I betabloccanti, incluso il propranololo, hanno un effetto potenziante su altri farmaci che diminuiscono la pressione sanguigna, o che diminuiscono la conduttività o la contrattività cardiaca.

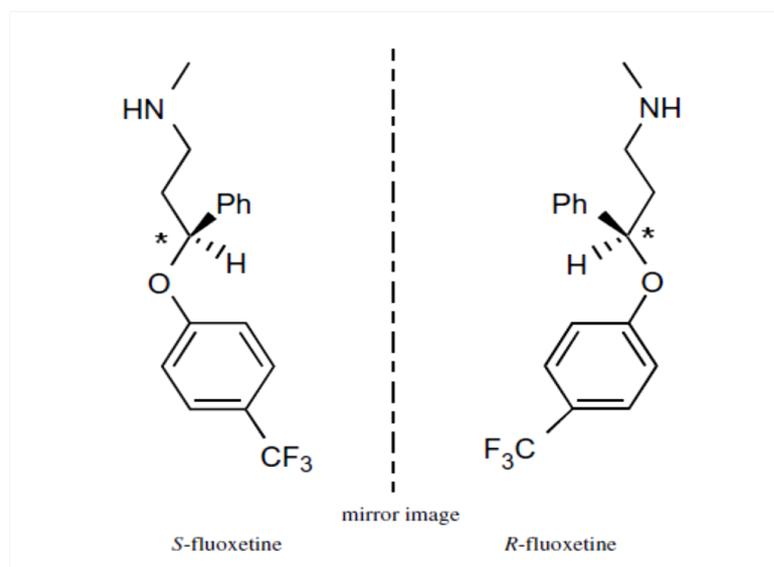
Il farmaco, una volta assunto dall'uomo, viene escreto tramite le urine in forma di metabolita. I tre metaboliti principali del propranololo sono il propranololo glucuronide, l'acido glucuronico, e i solfati coniugati di 4-idrossipropranololo. Quest'ultimo è il principale metabolita, con un'emivita maggiore (5,2-7,5 ore rispetto alle 3-4 ore del propranololo), ed è farmacologicamente attivo.

Gli effetti dell'esposizione cronica a questo farmaco nei cladoceri, tra cui *D.magna*, sono la riduzione del battito cardiaco, della respirazione (Brooks et al., 2003a), ma anche della riproduzione come numero di neonati prodotti (Dzialowski et al., 2006).

## 1.2.2 Fluoxetina

La fluoxetina ( $C_{17}H_{18}F_3NO$ ; nome IUPAC: (RS)-N-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy] propan-1-amine), è una molecola chirale che presenta i seguenti due enantiomeri: R-fluoxetina e S-fluoxetina (Figura. 1.8). Gli enantiomeri sono lipofili infatti valori di  $\log K_{ow}$  vanno da 1,25 (a pH 2) a 4,30 (a pH 11) ed aumentano all'aumentare del pH (Brooks et al., 2003).

Nel presente studio viene utilizzata la miscela racemica di fluoxetina, ossia che contiene in parti uguali entrambi gli enantiomeri.



**Figura 1.8** Struttura e configurazione degli enantiomeri della fluoxetina.

La fluoxetina appartiene al gruppo degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) quindi il suo meccanismo d'azione si esplica inibendo selettivamente una proteina carrier (*serotonin transporter*, SERT) nella membrana pre-sinaptica che è responsabile della ricaptazione della serotonina. Il risultato è un aumento della concentrazione della serotonina nella fessura sinaptica determinando, così, un aumento dell'interazione del neurotrasmettitore stesso con i recettori post-sinaptici. Entrambi gli enantiomeri sono approssimativamente equipotenti inibitori della ricaptazione della serotonina (Baumann et al., 2002). In particolare l'enantiomero R-fluoxetina ha attività antagonista verso i recettori della serotonina 5-HT<sub>2C</sub> nei vertebrati (Koch et al., 2002).

La fluoxetina oggi è utilizzata come farmaco antidepressivo usato per curare la depressione, i disturbi ossessivi-compulsivi e la bulimia nervosa. Essa è metabolizzata dagli isoenzimi

citocromo P-450 a norfluoxetina, il suo metabolita attivo, ed è escreto tramite urine. Rispetto alla dose somministrata di fluoxetina, il 10 % viene escreto dal corpo tal quale al composto somministrato (Hiemke and Härtter, 2000). Brooks et al. (2005) hanno rilevato la fluoxetina e la norfluoxetina nel cervello, fegato, e tessuti muscolari di tre differenti specie di pesci che vivevano in fiumi dominati dagli effluenti nel nord del Texas (USA). La più alta concentrazione misurata nel cervello di questi pesci è di  $1,58 \pm 0,74$  ng/g di fluoxetina e  $8,86 \pm 5,9$  ng/g di norfluoxetina. Questi dati riflettono il potenziale bioaccumulo di questo farmaco negli organismi.

Il ruolo della serotonina nella riproduzione, e pertanto il potenziale degli SSRI di perturbare le normali funzioni della serotonina, varia a seconda dei gruppi sistematici (Brooks et al., 2003a). Fong (2001) afferma che la serotonina e gli SSRI potenziano la deposizione e la maturazione degli oociti in alcuni bivalvi e crostacei.

In particolare per *Daphnia*, Campos et al. (2012) suggeriscono che anche se la proteina SERT su cui agisce il farmaco non è stata caratterizzata, il genoma di questo organismo codifica proteine strutturalmente simili alla proteina SERT dell'uomo, costituendo pertanto un presunto targets per gli SSRI. Gli effetti fisiologici risultano comunque differenti, infatti in *D. magna* la presenza di fluoxetina determina un cambiamento nella percezione della disponibilità di cibo, variando il suo ciclo di vita in risposta alle razioni di cibo limitate. La conseguenza è che le femmine producono più prole ma di dimensioni minori e questa prole matura precocemente rispetto alla prole non esposta. Infatti i risultati dei test cronici (30 giorni) su *D. magna* mostrano una stimolazione della riproduzione se essa viene esposta a 36 µg/L di fluoxetina (Nation, 2002).

### 1.3 La tossicità delle miscele

In passato si sono valutati sperimentalmente gli effetti tossici di singole sostanze, ma i contaminanti, compresi i farmaci, si trovano nell'ambiente acquatico come miscele con molteplici componenti. Per questo motivo sono necessari test ecotossicologici e modelli previsionali che valutino gli effetti delle miscele in modo tale che sia possibile effettuare valutazioni del rischio ambientale coerenti con la realtà. Difatti si è scoperto che le miscele

potrebbero presentare effetti differenti rispetto alla somma degli effetti dei singoli composti (Pomati et al., 2007).

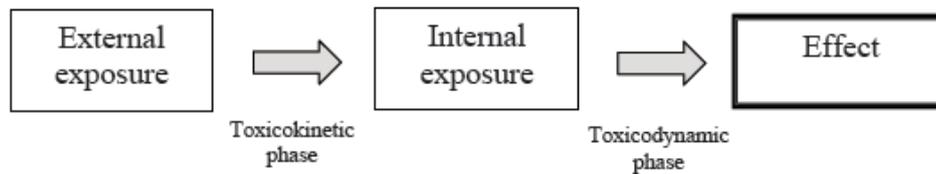
La *Norwegian Scientific Committee for Food Safety* (2008) riporta il modello di Plackett & Hewlett (1952), sviluppato sulla base di quello edito da Bliss (1939), sui possibili tipi di interazione che si verificano tra i componenti delle miscele di sostanze chimiche (Tabella 1.5)

**Tabella 1.5 I quattro possibili tipi di *joint action* per miscele (*Norwegian Scientific Committee for Food Safety*, 2008).**

	SIMILAR JOINT ACTION	DISSIMILAR JOINT ACTION
NON-INTERACTIVE	<i>Simple similar action (concentration addition)</i>	<i>Independent action (response addition)</i>
INTERACTIVE	<i>Complex similar action</i>	<i>Dependent action</i>

Si parla di *Simple similar action* quando i composti della miscela agiscono con lo stesso meccanismo sullo stesso sito biologico (es. recettore o organo bersaglio) ed è diversa solo la potenza con cui essi agiscono. Quindi ogni sostanza contribuisce alla tossicità della miscela in proporzione alla dose e la loro tossicità relativa si suppone sia costante a tutte le dosi. Invece, l'*Independent action* è presente quando le sostanze che agiscono contribuiscono ad un risultato comune, ma i meccanismi d'azione sono diversi. Inoltre, la natura e il sito d'azione può eventualmente, ma non necessariamente, essere diverso per le sostanze della miscela.

Nel caso vi sia interazione tra le sostanze si può avere *complex similar action* quando due composti agiscono con lo stesso meccanismo, ma non producono un effetto additivo e quindi si possono osservare effetti inferiore (antagonismo), o effetti superiori (sinergismo) all'effetto additivo. Invece *Complex dissimilar action* si ha quando c'è interazione nelle fasi tossicocinetiche (nei processi di alterazione dell'assorbimento, distribuzione, metabolismo o escrezione di un composto tossico derivante dall'esposizione ad un altro composto tossico) o tossicodinamiche (interazioni che avvengono a livello funzionale o cellulare sul recettore bersaglio), ma i due composti agiscono secondo meccanismi diversi (Figura 1.9).



**Figura 1.9 Relazione tra esposizione esterna ed effetti (Norwegian Scientific Committee for Food Safety, 2008).**

La valutazione delle proprietà tossicologiche delle miscele di sostanze chimiche richiede informazioni dettagliate sulla composizione della miscela e sui meccanismi d'azione di ogni singolo composto. Queste informazioni sono necessarie per effettuare una valutazione del rischio, però le miscele chimiche complesse possono contenere centinaia, o anche migliaia di composti, e la loro composizione è qualitativamente e quantitativamente non pienamente conosciuta e inoltre può variare nel tempo (*The Danish Veterinary and Food Administration, 2003*). Tuttavia gli impatti ambientali delle miscele sulle specie e sull'ecosistema devono essere considerate, ma testare ogni possibile combinazione di miscele è impossibile e non pratico (Faust et al., 2003).

Sulla base delle valutazioni precedenti Jonker et al. (2005) hanno formulato un approccio statistico per analizzare l'effetto congiunto di una data miscela: il MixTox.

Questo metodo, in teoria applicabile a miscele composte da numerose sostanze, è stato implementato per le miscele binarie in un formato di facile utilizzo, basato su fogli di calcolo in formato Microsoft Excel. Questo modello è basato su due differenti concetti: dose o concentrazione additiva (CA) e il modello dell'azione indipendente (IA).

Il modello CA, sviluppato da Loewe e Muischnek nel 1926, presuppone che le due sostanze chimiche analizzate abbiano lo stesso meccanismo d'azione (MoA), ossia agiscano sullo stesso percorso biochimico e strettamente sugli stessi targets molecolari (Heather et al., 2009). La concentrazione additiva, quindi, verifica se la tossicità relativa della miscela è uguale alla tossicità relativa dei singoli composti. Invece il modello IA presuppone che le sostanze agiscano sugli organismi con differenti MoA e le loro azioni siano pertanto statisticamente indipendenti da ogni altra. Quindi verifica se la probabilità di risposta di una sostanza chimica può essere indipendente dalla probabilità di risposta di un'altra sostanza.

Spesso si preferisce applicare entrambi i modelli IA e CA poiché le miscele chimiche possono essere composte da sostanze di cui è sconosciuta o ambigua la modalità d'azione. Questo caso può essere dovuto a specificità tossicodinamiche, come per esempio, sostanze singole

in miscele che possono agire sullo stesso enzima, cellula o organo, ma possono danneggiare processi fisiologici differenti (Loureiro et al., 2010).

Entrambi, CA e IA, sono modelli di riferimento che permettono di verificare l'effetto di una miscela tossica comparando gli effetti tossici con gli effetti tossici attesi calcolati sulla base della tossicità delle singole sostanze che compongono la miscela.

Rispetto a questi modelli di riferimento possono esserci delle deviazioni, e gli effetti delle miscele possono essere caratterizzati quantificando come i dati osservati deviano da entrambi i modelli di riferimento (Jonker et al., 2005). Quando vi è una deviazione, si può avere sinergismo o antagonismo (S/A), infatti tutte le combinazioni di miscele possono causare effetti più gravi (sinergismo) o meno gravi (antagonismo) rispetto a quelli calcolati sulla base del modello di riferimento scelto. Verificato che vi sia S/A allora, a partire da questo modello, si possono avere ulteriori deviazioni come la "*dose level-dependent*" (DL) se la deviazione a basse dosi è diversa dalla deviazione ad alte dosi (es. antagonismo può essere osservato a basse dosi e sinergismo ad alte dosi). Mentre, in alternativa a DL, quando le deviazioni dipendono dalla composizione della miscela allora si ha una deviazione "*dose ratio-dependent*" (DR), nel quale le sostanze sono principalmente responsabili della tossicità. Le deviazioni dal modello di riferimento possono avvenire quando le sostanze influenzano reciprocamente la biodisponibilità di altre, il loro MoA, e il loro comportamento in seguito all'uptake come, per esempio, il bioaccumulo (Loureiro et al., 2010).

Il MixTox, quindi, può essere utilizzato per caratterizzare la deviazione dal modello di riferimento delle miscele e valuta se e come i dati osservati deviano dai modelli CA e IA.

Nel seguito è riportato con maggior dettaglio il modo in cui le possibili interazioni tra sostanze tossiche che compongono una miscela sono formalizzate nell'ambito di MixTox, nel caso in cui il modello di riferimento sia la *concentration addition* (CA).

Considerando una miscela composta da un numero  $n$  (nel presente studio due) di sostanze chimiche che determina un effetto  $x$  % rispetto alla risposta del controllo, allora la CA si verifica se è valida la seguente equazione:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{ECx_i} = 1 \quad \rightarrow \quad \frac{c_1}{ECx_1} + \frac{c_2}{ECx_2} = 1 \quad (1)$$

Dove  $c_i$  è la concentrazione della sostanza  $i$  nella miscela e  $ECx_i$  è la concentrazione della sostanza  $i$  che ha lo stesso effetto  $x$  della miscela.

Per applicare la formula precedente è quindi necessario calcolare la concentrazione della singola sostanza  $i$  che è associata a una determinata risposta. Questo è stabilito dalla relazione concentrazione risposta che è data da  $Y = f(c_i)$ , dove  $Y$  è la risposta biologica degli organismi esposti (ad esempio il numero di neonati prodotti da una singola femmina) e  $f(c_i)$  è la funzione concentrazione risposta, quindi per calcolare la specifica concentrazione della sostanza  $i$  a partire dalla risposta è necessaria la funzione inversa:  $c_i = f_i^{-1}(Y)$ .

Assumendo che la funzione concentrazione risposta sia descritta dal modello logistico, si avrà:  $Y = top / (1 + (c/EC50)^\beta)$ , dove  $top$  è la risposta del controllo alla dose zero, l' $EC50$  è la concentrazione che determina un effetto del 50%, e  $\beta$  è il parametro di pendenza, allora:

$$Y = f(c_i) \quad \rightarrow \quad c_i = f_i^{-1}(Y) \quad (2)$$



$$Y = top / (1 + (c_i/EC50_i)^\beta) \quad \rightarrow \quad c_i = EC50_i * ((top - Y)/Y)^{1/\beta} \quad (3)$$



$$ECx_i = EC50_i * ((top - Y)/Y)^{1/\beta} \quad (4)$$

Di conseguenza per le miscele binarie secondo l'equazioni (1) e (4):

$$\underline{c_1/EC50_1 * ((top - Y)/Y)^{1/\beta}} + \underline{c_2/EC50_2 * ((top - Y)/Y)^{1/\beta}} = 1$$

(5)



$$\underline{TUx_1} + \underline{TUx_2} = 1$$

La concentrazione ora si riferisce direttamente al valore numerico della risposta biologica piuttosto che alla percentuale di risposta rispetto ai controlli.

I parametri presenti nel modello ( $\text{top}$ ,  $\text{EC50}_1$ ,  $\text{EC50}_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ), possono essere stimati con metodi iterativi sulla base di dati sperimentali (risposte biologiche osservate in organismi esposti a miscele con composizione nota).

Per quantificare la deviazione dal modello CA, l'equazione (1) può essere riscritta come funzione diretta della risposta biologica (Y) e generalizzata come segue:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{f_i^{-1}(Y)} = \exp(G)$$

(6)

Qui la concentrazione della sostanza  $i$  isolata che comporterebbe la stessa risposta biologica nella miscela (Y) può essere calcolata usando l'inverso della relazione dose risposta  $f_i^{-1}(Y)$ .

Il grado di deviazione dal modello CA è dato dalla quantità G e se  $G = 0$  allora la parte destra dell'equazione sarà uguale a 1, quindi corrisponde all'equazione (1), e non vi saranno deviazioni dal modello CA. Quest'ultima equazione può essere risolta tramite iterazioni.

Il secondo step prevede la valutazione del modello S/A, ossia viene valutata la presenza di sinergismo o antagonismo a partire dal modello CA. In questo caso il parametro G dell'equazione (1) deve essere uguale a:

$$G = a * z_1 * z_2$$

(7)

dove:

- $a =$  è il parametro che se risulta  $> 0$  indica antagonismo, invece se  $< 0$  indica sinergismo.
- $z_1$  e  $z_2 =$  sono la quantità relativa di unità tossica della sostanza 1 e della sostanza 2 nella miscela, e sono dati da  $z_1 = \text{UT}_1 / (\text{UT}_1 + \text{UT}_2)$  e  $z_2 = \text{UT}_2 / (\text{UT}_2 + \text{UT}_1)$ .
  - U.T. = Toxic Unit (unità tossica), quantifica il relativo contributo alla tossicità delle singole sostanze  $i$  nella miscela di  $n$  sostanze. È un valore adimensionale dato da  $c_i / \text{ECX}_i$ .

L'equazione (7) può essere generalizzata come segue:

$$G(z_1, \dots, z_n) = a \prod_{i=1}^n z_i$$

(8)

Anche nel caso del nuovo modello, i parametri ( $\alpha$ ,  $EC50_1$ ,  $EC50_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $a$ ) possono essere stimati con metodi iterativi sulla base di dati sperimentali.

Un'ulteriore deviazione da quest'ultima equazione può dipendere dalla composizione della miscela, cioè dal rapporto tra le concentrazioni dei singoli componenti. Quando ciò avviene si ha una deviazione "*dose ratio-dependent*" (DR), dove:

$$G(z_1, z_2) = (a + b_1 * z_1) * z_1 * z_2$$

(9)

Secondo questa equazione, l'intensità dell'antagonismo o nel sinergismo cambia in funzione della proporzione della sostanza 1 presente nella miscela, dove il parametro  $b_1$  determina l'entità del cambiamento.

L'alternativa a DR è la "*dose level-dependent*" (DL) ossia quando la deviazione dal modello di riferimento a basse concentrazioni in termini di UT totali nella miscela è diverso dalla deviazione ad alte dosi, indipendentemente dalla proporzione con cui ciascuna sostanza è presente nella miscela. In questo caso G è uguale a:

$$G = a * (1 - b_{DL} [UT_1 + UT_2]) * z_1 * z_2$$

(10)

Qui il valore di  $a$  indica la deviazione a basse dosi e il valore  $b_{DL}$  indica a quale dose si ha il cambiamento della deviazione (Loureiro et al., 2010).

Anche nel caso dei modelli DR e DL, i parametri possono essere stimati con metodi iterativi, sulla base di dati sperimentali.

L'interpretazione dei parametri è illustrata nella tabella seguente (Tabella 1.6):

Tabella 1.6 Interpretazione dei parametri nel modello CA (Jonker et al., 2005).

Parameter	Value		Meaning
	CA	IA	
			Synergism/antagonism
$a$	$>0$	$>0$	Antagonism
	$<0$	$<0$	Synergism
			Dose ratio dependence
$a$	$>0$	$>0$	Antagonism, except for those mixture ratios where significant negative $b_i$ s indicate synergism
	$<0$	$<0$	Synergism, except for those mixture ratios where significant positive $b_i$ s indicate antagonism
$b_i$	$>0$	$>0$	Antagonism where the toxicity of the mixture is caused mainly by toxicant $i$
	$<0$	$<0$	Synergism where the toxicity of the mixture is caused mainly by toxicant $i$
			Dose level dependence
$a$	$>0$	$>0$	Antagonism low dose level and synergism high dose level
	$<0$	$<0$	Synergism low dose level and antagonism high dose level
$b_{DL}$	$>1$	$>2$	Change at lower dose level than the EC50
	$=1$	$=2$	Change at the EC50 level
	$0 < b_{DL} < 1$	$1 < b_{DL} < 2$	Change at higher dose level than the EC50
	$<0$	$<1$	No change, but the magnitude of synergism/antagonism is dose level (CA) or effect level (IA) dependent

Per identificare il tipo interazione che si realizza tra le due o più sostanze tossiche che compongono una miscela è necessario verificare quale tra i modelli appena descritti si adatti meglio ai dati sperimentali. A questo scopo, usando i dati sperimentali si stimano i parametri per tutti i modelli precedentemente descritti. L'adattamento di ogni modello ai dati è quindi valutato quantificando la somma dei quadrati dei residui ( $SS_{res}$ ), intendendo per residuo la differenza tra la risposta biologica osservata sperimentalmente e quella attesa sulla base del modello. Minore è il valore di  $SS_{res}$  maggiore sarà l'adattamento del modello ai dati sperimentali.

Per verificare se un modello più complesso, che prevede un maggior numero di parametri fornisca un adattamento significativamente maggiore rispetto ad un modello più semplice, ad esempio per confrontare il modello S/A con quello CA senza interazione, si esegue il test

statistico del chi-quadrato  $\chi^2$  utilizzando il rapporto tra i valori di  $SS_{res}$  dei due modelli a confronto.

La procedura illustrata può essere riassunta dallo schema riportato in figura 1.10:

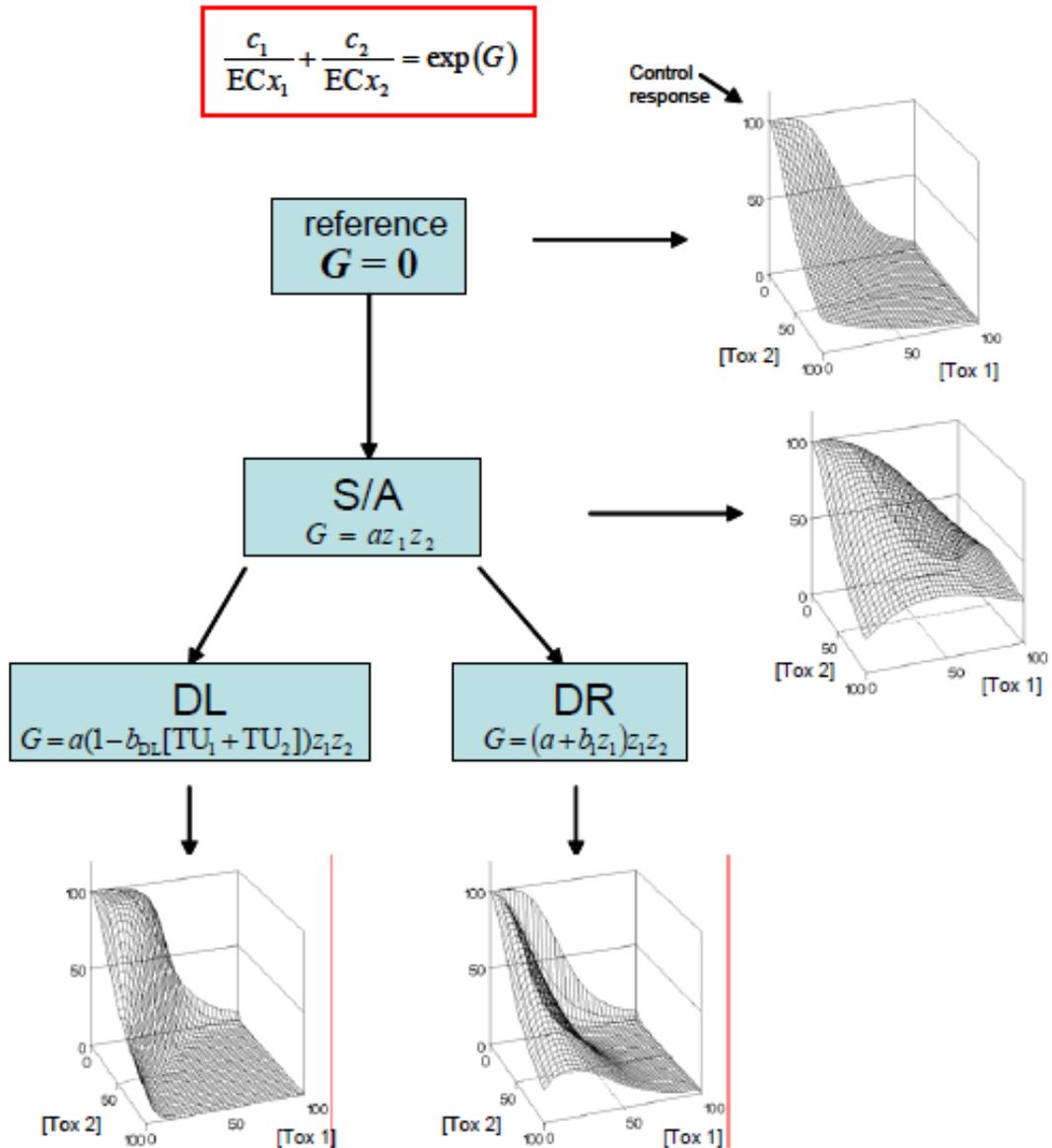


Figura 1.10 Schema di flusso rappresentante lo sviluppo per una miscela binaria a partire dal modello CA.

## 1.4 *Daphnia magna* Straus, 1820

### 1.4.1 Morfologia

*Daphnia magna* Straus, 1820 è un piccolo (non supera i 5 mm di lunghezza) crostaceo d'acqua dolce appartenente alla classe dei Phyllopoda, chiamati anche Branchiopoda, caratterizzati da arti appiattiti e ramificati, detti fillopodi. All'interno dei Branchiopoda appartiene all'ordine dei Cladocera, sottordine degli Anomopoda, famiglia Daphniidae.

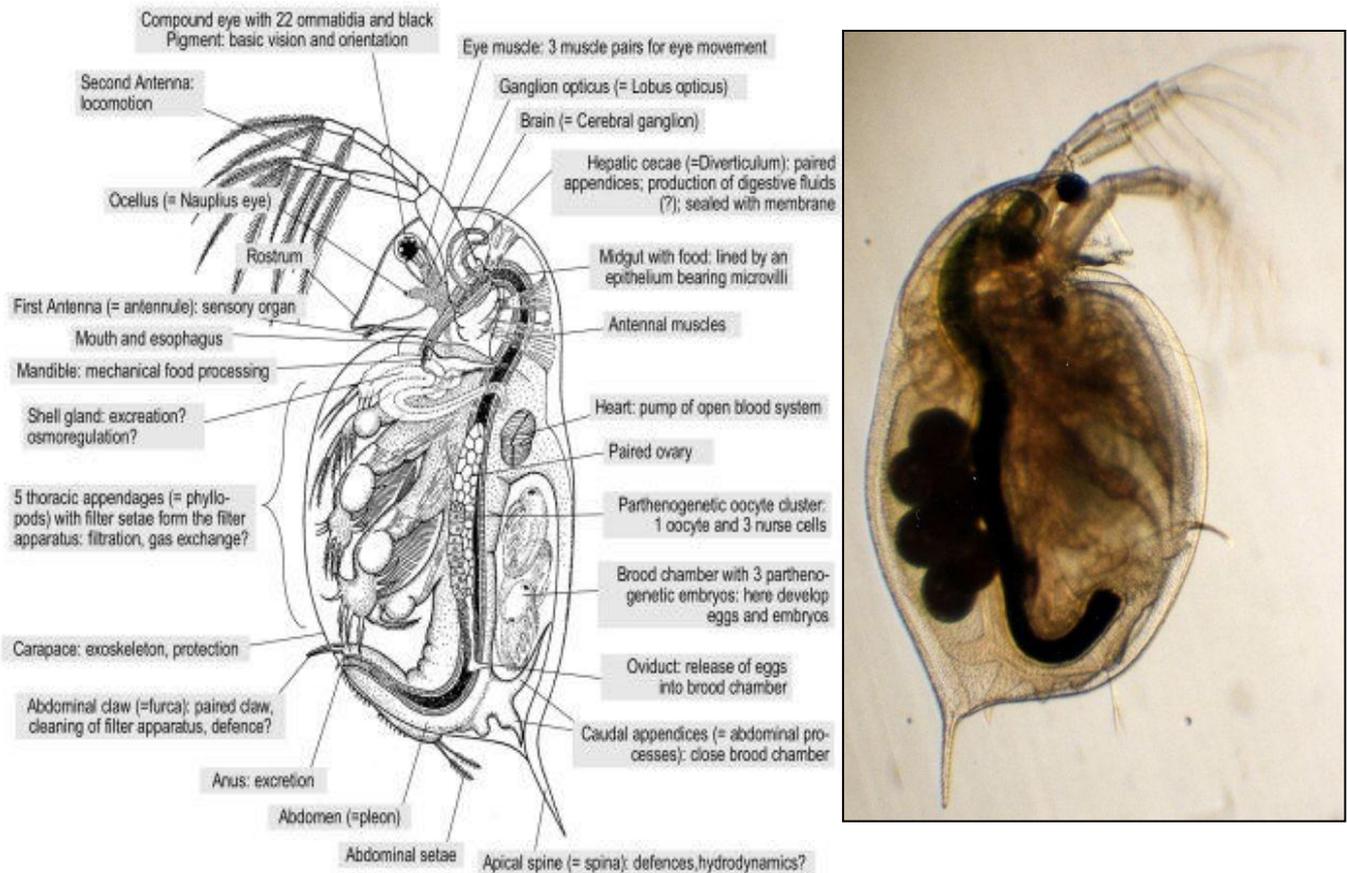
Le specie del genere *Daphnia* presentano un capo che si espande dorsalmente e lateralmente per formare uno scudo cefalico. In esso vi è un singolo occhio composto, sessile e fortemente pigmentato, un ocello di minori dimensioni e due paia di antenne, di cui le seconde, biramose e molto sviluppate, hanno funzione natatoria.

Il tronco è alloggiato in un carapace bivalve, in gran parte di chitina, ben sviluppato, privo di articolazioni e lateralmente compresso. È corto, e i suoi segmenti sono fusi. La regione toracica presenta cinque paia di arti fillopodi, i quali sono finalizzati esclusivamente all'alimentazione. Le particelle una volta filtrate, sono trasferite all'apertura orale, triturate dall'apparato boccale e passate nel tratto digerente ripiegato a "J". Questo è facilmente visibile così come la camera incubatrice situata dorsalmente nella femmina.

Il tratto posteriore dell'addome, indicato nei cladoceri come post-addome, profondamente sinuato nel dorso (carattere che la distingue dalle altre specie), è ripiegato in direzione anteriore sotto il tronco ed è formato da un paio di lunghe sete e da un paio di grosse unghie terminali (Figura 1.11).

*D.magna* presenta dimorfismo sessuale, infatti i maschi si distinguono dalle femmine per le loro dimensioni più piccole (2-3 mm), prime antenne più grandi, e infine sono modificati nel post-addome e nei primi arti che sono armati di un uncino utilizzato per agganciarsi.

L'accrescimento di *Daphnia* avviene per stadi o mute, in modo discontinuo, con rigetto ad ogni fase del vecchio esoscheletro, che viene sostituito con uno di nuova formazione. Nella femmina sessualmente matura l'esoscheletro viene abbandonato dopo ogni parto (Ebert, 2005).



**Figura. 1.11** Morfologia di *Daphnia magna* (Ebert, 2005).

#### 1.4.2 Ciclo vitale e sviluppo

Il ciclo vitale di *D. magna* è scandito da episodi alterni di riproduzione partenogenetica e bisessuale. In generale la riproduzione è partenogenetica e la popolazione è costituita solamente da femmine per diverse generazioni. Queste femmine producono uova estive diploidi, che schiudono generando altre femmine. Nel corso di questo periodo, ogni femmina produce una successione di deposizioni partenogenetiche. Lo sviluppo diretto si compie all'interno della camera d'incubazione dorsale. Quando i piccoli lasciano la camera, l'esoscheletro materno subisce una muta e nella nuova camera d'incubazione è liberata una nuova deposizione di uova. La liberazione dei piccoli, la muta e la deposizione successiva di

uova possono avvenire in cinque minuti. I vantaggi di questa riproduzione asessuata sono: la conservazione di genotipi favorevoli, maturazione precoce e alta fecondità.

Alcuni fattori ambientali, infine, come una variazione del fotoperiodo o nella temperatura dell'acqua, o una riduzione della disponibilità di cibo determinata da elevate densità di popolazione, fanno sì che le uova prodotte diano origine a maschi. Comparso il maschio nella popolazione, avvengono gli accoppiamenti e le femmine producono uova diploidi, fecondate e durature. In una singola deposizione, sono prodotte solo due di queste uova, una da ciascun ovario, liberate nella camera d'incubazione, le cui pareti sono trasformate in una capsula protettiva, nota come efippio. Questo viene abbandonato alla muta successiva, e si separa o rimane unito al resto dell'esuvia abbandonata. Gli efippi galleggiano, affondano o aderiscono a oggetti e possono tollerare essiccamento, congelamento e persino il passaggio attraverso l'intestino di pesci planctivori, di uccelli o mammiferi che si nutrono di pesci. Per mezzo di queste uova durature, protette e resistenti all'essiccamento, i Cladoceri possono essere dispersi su grandi distanze dal vento o da animali, e possono superare l'inverno o sopravvivere alla siccità estiva. Quindi i vantaggi della riproduzione sessuale sono la creazione di variazione genetica (materiale per la selezione naturale e l'evoluzione), la riparazione del DNA durante la ricombinazione e l'evitato accumulo di mutazioni deleterie, e infine la resistenza ai parassiti (sia genetico che ecologico).

Quindi *Daphnia* produce due tipi di uova: uova estive e uova durature. Le uova estive con guscio sottile, note anche come uova subitane, sono prodotte in condizioni ambientali favorevoli. Lo sviluppo all'interno delle uova estive è rapido, la schiusa può avvenire nella camera d'incubazione e i piccoli possono rimanere nella camera per poco tempo. Lo sviluppo è diretto e i piccoli sono liberati dalla camera d'incubazione in seguito a flessione ventrale del post-addome della femmina.

Le uova durature, o letargiche, costituiscono un adattamento agli habitat che presentano condizioni periodiche avverse. Lo spesso guscio consente all'uovo o all'embrione di sopravvivere a periodi durante i quali le normali attività non sono realizzabili. All'interno del guscio, il contenuto d'acqua è inferiore all'1% e il tasso metabolico è ridotto quasi a zero. La produzione di uova durature può essere stimolata da diversi fattori esterni, come la densità di popolazione, la temperatura o il fotoperiodo. Un uovo duraturo può compiere uno sviluppo iniziale e generare un embrione, prima di entrare in diapausa. Quando le condizioni

ambientali tornano favorevoli, gli embrioni sono presenti e pronti per schiudersi in tempi brevi. La diapausa è interrotta da condizioni ambientali favorevoli, che possono essere segnalate da variazioni della tensione di ossigeno disciolto, della salinità, temperatura o illuminazione. Si tratta di segnali specie-specifici e correlati all'habitat (Ruppert et al., 2004).

#### 1.4.3 Alimentazione

*Daphnia* è un organismo filtratore che si nutre di piccole particelle in sospensione nell'acqua. Il cibo viene raccolto con l'aiuto di un apparato filtrante, costituito da fillopodii, cioè arti appiatti che muovendosi producono una corrente d'acqua. L'apparato filtrante è così efficiente, con maglie spesso minori di un 1  $\mu\text{m}$ , che anche i batteri possono essere raccolti, ma il cibo è di solito costituito da alghe planctoniche, in particolare le alghe verdi.

Solitamente consuma particelle che vanno da circa 1  $\mu\text{m}$  fino a 50  $\mu\text{m}$ , anche se particelle di 70  $\mu\text{m}$  di diametro possono essere trovate nel contenuto intestinale di grandi individui (Ebert, 2005).

#### 1.4.4 Comportamento

Il nome comune per *Daphnia*, pulce d'acqua (*water flea* in inglese), ha origine dal movimento simile ad un salto che presenta durante il nuoto. Questo comportamento è dovuto al battito delle seconde antenne di grandi dimensioni che vengono usate per orientarsi nell'acqua. Il rapido battito produce un veloce movimento verso l'alto, mentre la relativamente alta densità degli organismi determina un affondamento, infatti *Daphnia* quando è immobile sprofonda rapidamente sul fondo.

Un secondo ben noto comportamento è la migrazione verticale giornaliera, ovvero quando migra verso i più alti livelli del corpo d'acqua durante la notte e poi di nuovo verso il basso durante il giorno. Questo comportamento probabilmente si è sviluppato come strategia per evitare i predatori. Durante il giorno, si nasconde visivamente dai predatori che cacciano muovendosi nell'oscurità a profondità maggiori, mentre durante la notte approfitta della presenza del cibo (alghe planctoniche) nei livelli superiori e più illuminati delle acque (Ebert, 2005).

#### 1.4.5 Habitat

Il genere *Daphnia* comprende più di cento specie conosciute di organismi planctonici d'acqua dolce che si possono trovare in tutto il mondo. Abitano la maggior parte delle tipologie di acque dolci permanenti ad eccezione degli habitat estremi, come ad esempio le sorgenti d'acqua calda. Vivono come filtratori, e alcune specie possono spesso essere viste aggrappate a substrati, come piante acquatiche, o che nuotano sul fondo di stagni poco profondi.

In molti laghi, *Daphnia* è il cibo predominante per i pesci che si nutrono di plancton. Di conseguenza, la distribuzione delle specie di *Daphnia* e il loro ciclo di vita, sono strettamente legati alla presenza dei predatori. In genere, le specie che si trovano in laghi con pesci planctivori sono più piccole e trasparenti delle specie che si trovano nei corpi d'acqua senza pesci planctivori. Le specie di grandi dimensioni, come *D. magna*, solitamente non sopravvivono in caso di predazione intensiva da parte dei pesci, invece le specie di piccole dimensioni di solito non si trovano nei corpi idrici senza pesci.

La qualità delle acque ideale per l'habitat di *Daphnia* può variare notevolmente. Un pH tra 6,5 e 9,5 è accettabile per la maggior parte delle specie, però sarebbe ottimale compresa tra 7,2 e 8,5. La salinità di solito dovrebbe essere inferiore al 5 % dell'acqua di mare (circa 1,5 grammi di sale marino per litro), ma alcune specie possono tollerare salinità maggiori, come *D. magna*, che si può trovare fino al 20% di acqua di mare.

In particolare *D. magna* è una specie di grandi dimensioni che si può trovare in tutte le parti temperate dell'Emisfero Nord, specialmente in stagni ricchi di piccole alghe. In parte, la loro presente distribuzione probabilmente riflette la dispersione artificiale. Gli habitat naturali sono pozze temporanee e poco profonde, grandi laghi di steppe, praterie e tundra (Ebert, 2005).

#### 1.4.6 Modulatori fisiologici

Esistono diversi fattori che influenzano questo piccolo organismo, i più importanti fattori estrinseci sono: la temperatura, la luce, la concentrazione dell'alimento, e la densità di popolazione.

*Daphnia* è un organismo euritermo, ciò probabilmente riflette i bruschi cambiamenti della temperatura incontrati durante i cicli giornalieri di riscaldamento e raffreddamento di piccole pozze, e nella migrazione verticale nei laghi stratificati. Le colture di *D. magna* possono essere mantenute a temperatura costante dai 2 ai 30 o 35 °C. A temperatura costante, i limiti per una rapida riproduzione sono piuttosto stretti, e sarebbe meglio per le colture un range tra 15 e 25 °C. Allo stesso modo i tassi di filtrazione hanno picchi o plateau dai 15 ai 25 °C così come i tassi di assimilazione e crescita. Invece i tassi di respirazione e sviluppo aumentano con la temperatura per la maggior parte del range vitale.

Un altro importante fattore è la luce che è nota da tempo per la sua influenza sul comportamento dei daphnidi. Studi sull'alimentazione hanno mostrato bruschi cambiamenti nel tasso di ingestione associato alla luce e al ciclo diurno sia in situ che in laboratorio.

È noto che la respirazione sia influenzata dalla fornitura di carburante metabolico e quindi che la concentrazione dell'alimento sia un elemento fondamentale. Molti studi hanno indicato che anche per un breve periodo la mancanza di cibo può influenzare la fisiologia dei daphnidi, per esempio rallentando il flusso e il ricambio di carbonio e fosforo, influenzando sulla risposta degli animali alla luce e riducendo i tassi di utilizzo dei tessuti. Il tasso di respirazione di *Daphnia* aumenta del 30% o più con la disponibilità di cibo.

Infine l'influenza della densità di popolazione sul comportamento di *Daphnia* che è critica per la rilevanza dei risultati di laboratorio, infatti negli habitat naturali come i laghi, la concentrazione, anche di dense popolazioni di zooplancton si trova ben al di sotto di quelle usate spesso negli esperimenti (Peters and De Bernardi, 1987).

#### 1.4.7 Perché studiare *Daphnia magna*?

Il genere *Daphnia* è comunemente usato nei test di tossicità acquatica poiché molti dei suoi caratteri la rendono facile ed economica per le colture in laboratorio: è relativamente piccola, ha un ciclo di vita breve, alta fecondità e riproduzione partenogenetica. Inoltre è facilmente campionabile e sopravvive bene in coltura. Inoltre, è adatta agli studi in quanto elemento importante nell'ecologia degli ambienti lenticì e, pertanto, le interazioni di caratteri specifici e regole generali in questo caso possono avere implicazioni significative.

In particolare la specie *Daphnia magna* differisce dal resto dello zooplancton di acqua dolce nelle dimensioni, habitat, ciclo vitale, e abilità a resistere alla predazione dei pesci. *D. magna* è una specie di zooplanctonica relativamente grande che, rendendosi così vulnerabile alla predazione dei pesci, viene esclusa dai laghi in cui essi sono presenti. Si presenta principalmente negli habitat effimeri, come piccole pozze, dove i predatori vertebrati sono rari. Le piccole pozze sono habitat imprevedibili con grande variabilità temporale e spaziale dei fattori abiotici.

*Daphnia* è stata studiata da molti punti vista, infatti la specie *D. magna* era già usata nei test di tossicità durante gli anni 40, e negli ultimi anni è stata ampiamente usata in test regolamentari così come nella ricerca di base dell'ecotossicologia (Peters and De Bernardi, 1987).

#### 1.4.8 Vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di *Daphnia magna*

Questo genere è onnipresente nell'olarctico (regione biogeografica che comprende la maggior parte dell'emisfero boreale) e gioca un ruolo importante nella catena alimentare degli ecosistemi d'acqua dolce, infatti è tra i consumatori dominanti dei produttori primari ed è anche un cibo fondamentale sia per i predatori invertebrati che vertebrati.

Buikema et al. (1976) scoprì che *Daphnia magna* è più sensibile di altre tredici specie di vertebrati e tre pesci ad una "arbitraria miscela di riferimento". In generale la selezione delle specie per i test dipende dagli specifici obiettivi dello studio, infatti per scopi comparativi nel tempo (per esempio, per verificare la persistenza di composti o effetti subletali), o tra diverse sostanze tossiche, le specie scelte sono quelle più facilmente allevate in laboratorio. Sulla base di quanto appena detto, *D. magna* è stata spesso proposta per diverse ragioni: tra i daphnidi, è uno dei più facili da gestire, adatto sia per flussi statici, intermittenti o continui in condizioni di acquario o microcosmo; si riproduce partenogeneticamente, assicurando l'uniformità di risposta alle condizioni ambientali; ha una durata di vita sufficientemente breve e un ciclo riproduttivo da permettere test di tipo cronico; infine avendo piccole dimensioni, le culture sono poco costose (rispetto a pesci, molluschi e crostacei).

Vanno anche considerati i seguenti svantaggi: la sensibilità, in *Daphnia*, alle sostanze tossiche dipende dall'età; *Daphnia* a digiuno non dovrebbe essere usata nei test di tossicità

che durano più di 48 ore; quando vengono alimentate, una variabile quantità di sostanze tossiche viene assorbita attraverso l'ingestione di particelle contaminate invece di un diretto assorbimento dall'acqua.

Inoltre è necessario considerare che negli esperimenti a lungo termine, differenze nelle procedure di alimentazione e nella sostituzione del mezzo nei test possono essere importanti (Peters and De Bernardi, 1987).

## 2. SCOPO DEL LAVORO

I farmaci sono regolarmente rilevati nelle acque reflue, acque superficiali e nel biota acquatico (Kolpin et al., 2002; Brooks et al., 2005), così che vi è una esposizione continua degli organismi a queste sostanze. Essi possono entrare nell'ambiente seguendo diversi percorsi, incluso lo smaltimento inadeguato (incendi, scarichi dalla toilette, dai rifiuti destinati alla discarica) in forme trasformate o immutate (Minagh et al., 2009). I potenziali rischi associati al rilascio di farmaci nell'ambiente sono diventati un problema sempre più importante per le autorità ambientali e l'industria farmaceutica (Jørgensen and Halling-Sørensen, 2000; Kümmerer, 2004).

Lo scopo generale dello studio è effettuare un'analisi sperimentale di laboratorio per valutare gli effetti a lungo termine dei farmaci propranololo e fluoxetina, in particolare nel caso di una loro presenza contemporanea, su una specie rappresentativa dello zooplankton d'acqua dolce: *Daphnia magna* Straus, 1820.

In primo luogo, lo studio intende ricavare nuove informazioni, e conferme, sugli effetti cronici dei singoli farmaci presenti come residui nell'ambiente. Inoltre questa fase ha lo scopo di definire al meglio il range di concentrazioni da utilizzare nei successivi test.

La seconda parte dello studio riguarda esperimenti con miscele dei due farmaci e l'elaborazione, tramite l'approccio MixTox, di un modello previsionale degli effetti tossici di queste miscele. In particolare si intende usare il MixTox per stabilire il tipo di interazioni tra i farmaci in esame, evidenziando l'eventuale presenza di sinergismo o antagonismo, e definendo se questi fenomeni sono dipendenti dalla composizione delle miscele o dalla loro concentrazione.

In conclusione le informazioni ricavate rappresentano una frazione minima, ma essenziale, per la valutazione dei rischi ambientali causati dai farmaci rilasciati nelle acque superficiali.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Allevamenti

In laboratorio è stato creato un allevamento di *Daphnia magna* utilizzando 5 vasche di materiale plastico con una capacità di 8 litri ciascuna. Ogni vasca contiene 100 individui adulti di sesso femminile allevati in una soluzione di acqua, il cui volume totale è costituito da un 50% di acqua minerale commerciale (Guizza) e un 50% di acqua ricostituita ottenuta secondo le indicazioni contenute nel metodo ISO 6341 (ISO,1996) (Tabella 3.1). Questa miscela sarà d'ora in poi indicata come acqua di allevamento.

**Tabella 3.1 Composizione dell'acqua di diluizione secondo il protocollo ISO 6341 (ISO, 1996) e dell'acqua Guizza.**

Composizione	Acqua Guizza (mg/L)	ISO (mg/L)
Magnesio $^{2+}$	28,7	12
Nitrati $\text{NO}_3^-$	8,7	
Solfati $\text{SO}_4^{2-}$	4,0	0,05
Potassio $\text{K}^+$	1,1	3
Calcio $\text{Ca}^{2+}$	49	80,5
Silice $\text{SiO}_2$	17,5	
Sodio $\text{Na}^+$	6,5	17,7
Cloruri $\text{Cl}^-$	2,4	0,003
Fluoruri $\text{F}^-$	<0,15	

Questa soluzione viene prelevata da uno stock mantenuto in continua ossigenazione tramite una insufflazione di aria. Quest'acqua è necessario abbia, in particolare prima di ogni test, una concentrazione di ossigeno maggiore di 3 mg/L, un pH tra 6 e 9, e una durezza maggiore di 140 mg/L, in termini di  $\text{CaCO}_3$ . La miscela creata ha composizione chimica simile a quella richiesta per lo svolgimento dei test acuti secondo il metodo ISO 6341, ma al tempo stesso è in grado di garantire la sopravvivenza degli organismi a lungo termine e la loro riproduzione.

Le vasche di allevamento sono mantenute in una cella termostatica a temperatura costante di  $20 \pm 1$  °C, in ambiente ventilato e privo di vapori o polveri potenzialmente tossiche. L'interno è illuminato mediante lampade a fluorescenza con fotoperiodo di 16 ore (16 ore di luce e 8 di buio) e l'illuminamento a cui sono sottoposte le vasche di allevamento è di 400-800 lux.

Ogni sette giorni, in particolare ogni lunedì, si effettua la pulizia delle vasche, cioè viene filtrata l'acqua tramite un setaccio per eliminare gli individui giovani nati durante la settimana, viene verificata la presenza delle 100 *Daphnia* femmine, e sono eliminati eventuali individui maschi. Ogni coltura dopo un periodo di quattro settimane viene rinnovata, ossia vengono eliminati sia l'acqua che le *Daphnia* adulte, vengono selezionati 100 piccoli giovani tra i più grandi presenti nella vasca da rinnovare e con questi viene creata una nuova vasca con acqua di allevamento prelevata dallo stock in aerazione. Tutte le informazioni ricavate, tra cui anche la presenza di individui adulti morti, maschi o efippi sono annotate singolarmente per ogni vasca.

Le *Daphnia* vengono nutrite tre volte a settimana con microalghe vive e lievito. A giorni alterni sono somministrate ad ogni vasca 10 mL di alghe e 15 mL di lievito, mentre il venerdì 20 mL di entrambi. La concentrazione di alghe somministrata alle vasche è dell'ordine di  $10^7$  cell/L.

Per quanto riguarda il lievito si utilizza una sospensione ottenuta miscelando 1 g di lievito di birra con 125 mL di acqua di allevamento. Le alghe utilizzate appartengono alla specie unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata*. Queste vengono coltivate in beute da 1 litro in condizioni controllate di temperatura ( $20^\circ \pm 1$ ), illuminazione (fotoperiodo di 16 ore) ed areazione costante. Le nuove beute vengono avviate con circa 10/15 mL di alghe precedentemente coltivate in un'altra beuta, acqua distillata e terreno di coltura in rapporto 10:1. Il terreno di coltura utilizzato è quello suggerito da Gorbi (1987). Dopo circa una settimana di incubazione, una volta vi sia stata una abbondante proliferazione di alghe visibile dal colore verde intenso, il contenuto della beuta è travasato in un beacker dove rimarrà finché si saranno depositate tutte le alghe, e quindi, il surnatante è completamente trasparente. Il deposito poi prelevato, viene portato a volume fino a 125 mL con acqua di allevamento, ottenendo la sospensione utilizzata per l'alimentazione degli organismi.

### 3.2 Test acuto su tossico di riferimento (dicromato di potassio)

Il test acuto con dicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), è stato effettuato periodicamente, con lo scopo di verificare che la sensibilità di *Daphnia magna* si mantenesse all'interno di un intervallo di variabilità accettabile. Il test è stato condotto secondo le indicazioni dei protocolli ISO 6341 (ISO, 1996) e OECD 202 (OECD, 2004), sostanzialmente equivalenti che prevedono come endpoint (caratteristica biologica utilizzata per valutare l'effetto avverso della sostanza tossica) l'immobilizzazione. Sono definiti immobili gli organismi che, anche presentando movimenti delle appendici, non sono in grado di spostarsi neanche a seguito di una leggera stimolazione. Questo endpoint è usato perché la mortalità negli organismi di queste dimensioni è difficile da valutare con certezza.

Il test acuto prevede almeno cinque concentrazioni disposte in una serie geometrica con fattore di separazione non maggiore di 2,2, di cui la più alta concentrazione deve determinare il 100 % di immobilizzazione e la più bassa nessun effetto osservabile. Quindi sono state preparate 7 concentrazioni crescenti, con due repliche per concentrazione, in serie geometrica da 0,80 a 3,00 mg/L di dicromato di potassio ottenute diluendo una soluzione stock di 100 mg/L e un trattamento di controllo con solo acqua di diluizione. Come acqua di diluizione si è utilizzata quella ricostruita secondo le indicazioni del metodo ISO 6341. Durante il test acuto non è stato somministrato alcun alimento.

Ogni replica era costituita da un beacker da 25 mL, contenente 20 mL di soluzione nei quali sono stati inseriti 5 neonati con meno di 24 h di età. Per ottenere individui con queste caratteristiche, il giorno precedente all'inizio di ogni test venivano isolate le femmine adulte all'interno delle vasche di allevamento eliminando tutti gli individui giovani e annotando l'ora dell'isolamento per ogni vasca. Gli individui nati all'interno delle vasche di allevamento da questo momento erano utilizzabili per i test. Il giorno successivo, passate meno di 24 ore dall'isolamento delle femmine adulte, si sceglieva la vasca di allevamento dal quale prelevare gli organismi da testare. La scelta della vasca era fatta sulla base del numero di neonati presenti, in modo da utilizzare individui provenienti da un'unica vasca, e sulla base dell'assenza di segni di stress (mortalità, presenza di maschi, efippi, animali scoloriti).

Dopo 24 ore dall'inizio del test è stato contato in ciascun beacker il numero di individui immobilizzati.

### 3.3 Test per la determinazione del regime alimentare

Il test cronico per la determinazione del regime alimentare è stato condotto seguendo le indicazioni, sostanzialmente equivalenti, dei protocolli ISO 10706 (ISO, 2000) e OECD 211 (OECD, 2008).

In questo caso i trattamenti confrontati non sono stati concentrazioni di sostanze tossiche. Questo test ha previsto l'esposizione degli individui, a diverse densità di alghe e lievito con lo scopo di identificare un regime alimentare che garantisse lo sviluppo esclusivo di organismi di sesso femminile. Era infatti stato precedentemente osservato che la quantità di alghe e lievito necessaria a far produrre alle femmine un numero sufficiente di neonati era eccessiva durante i primi giorni di esposizione e tendeva a favorire lo sviluppo di individui di sesso maschile.

Prima, e ogni qual volta necessario, del test e in generale prima di ogni test cronico, avviene il conteggio delle alghe che permette la determinazione della concentrazione di alghe. Per fare questo un'aliquota della sospensione di alghe preparata secondo la procedura riportata al paragrafo 3.1 è stata diluita in proporzione 1:5. Così si preleva una goccia da questa soluzione e la si posiziona in una camera di Bürker per poter osservare e contare al microscopio le microalghe. La camera di Bürker è uno speciale vetrino da microscopio, originariamente messo a punto per il conteggio delle cellule del sangue, su cui è inciso un reticolo di dimensioni note. Nel reticolo si possono individuare diverse serie di rettangoli che si susseguono orizzontalmente, e che sono stati scelti come area nel quale effettuare la conta delle singole cellule. Inoltre il conteggio totale delle alghe è fatto su due repliche grazie al rinnovo della sospensione applicata al vetrino. La media dei risultati ottenuti dal conteggio hanno permesso il calcolo della densità della sospensione di volta in volta preparata. Sulla base di questa informazione si effettuavano una serie di diluizioni per raggiungere la concentrazione voluta ( $1,250 \cdot 10^8$  cell/L/day).

Ogni replica sperimentale era costituita da un beacker da 100 mL contenenti una soluzione di 50 mL con acqua di allevamento e gli alimenti. All'inizio del test in ciascun beacker è stato posto un singolo neonato con età inferiore alle 24 ore secondo le modalità definite nel paragrafo 3.2. Sono stati così confrontati 4 trattamenti (regimi alimentari diversi, Tabella 3.2), ciascuno con 10 repliche.

Una volta preparati, i beacker sono stati posizionati in modo casuale nell'incubatore, lo stesso in cui erano mantenute le vasche di allevamento in modo tale che le condizioni ambientali fossero le stesse, chiudendoli con parafilm in modo da impedire l'evaporazione.

Le soluzioni nei beacker sono state rinnovate 3 volte a settimana (lunedì, mercoledì, venerdì) trasferendo ciascun individuo in un nuovo beaker. Nella stessa occasione si procedeva all'alimentazione degli individui, al conteggio dei neonati e alla loro eliminazione.

Il disegno sperimentale per la prima settimana è illustrato nella tabella (3.2) e parte dal presupposto che una dose giornaliera (DG) per una singola *Daphnia* adulta sia di  $1,250 \cdot 10^8$  cell/L per le alghe e di 80 mg/L di lievito.

Questa razione giornaliera si era infatti dimostrata necessaria per ottenere la produzione di 60 neonati durante il test, come richiesto dal protocollo adottato. I quattro trattamenti sono stati determinati dalla riduzione della dose giornaliera al 50% o 75%, e dalla periodicità della somministrazione degli alimenti, ossia tutti i giorni o a giorni alterni. Le differenze riguardavano solo i primi giorni del test, mentre a partire dal terzo o quarto giorno il regime alimentare diventava lo stesso in tutti i trattamenti (100% della dose giornaliera, somministrazione tutti i lunedì, mercoledì, venerdì).

**Tabella 3.2 Disegno sperimentale del test per l'individuazione del regime alimentare: dosi di alghe e lievito somministrate ai quattro trattamenti (A, B, a, b) nei diversi giorni della prima settimana di test.**

GIORNI	<i>Martedì</i>	<i>Mercoledì</i>	<i>Giovedì</i>		<i>Venerdì</i>	<i>Lunedì</i>
<b>ALGHE</b>						
TRATTAMENTI	Cell/L				Cell/L	
<b>A</b>	$0,937 \cdot 10^8$ (75% DG)	$0,937 \cdot 10^8$ (75% DG)	$0,937 \cdot 10^8$ (75% DG)		$2,5 \cdot 10^8$ (2*DG)	$2,5 \cdot 10^8$ (2*DG)
<b>B</b>	/	$1,874 \cdot 10^8$ (2*75%DG)	/		$2,5 \cdot 10^8$ (2*DG)	$2,5 \cdot 10^8$ (2*DG)
<b>a</b>	$0,625 \cdot 10^8$ (50% DG)	$0,625 \cdot 10^8$ (50% DG)	$0,625 \cdot 10^8$ (50% DG)		$2,5 \cdot 10^8$ (2*DG)	$2,5 \cdot 10^8$ (2*DG)
<b>b</b>	/	$1,250 \cdot 10^8$ (2*50%DG)	/		$2,5 \cdot 10^8$ (2*DG)	$2,5 \cdot 10^8$ (2*DG)

LIEVITO					
TRATTAMENTI	mg/L			mg/L	
<b>A</b>	60 (75% DG)	60 (75% DG)	60 (75% DG)	160 (2*DG)	160 (2*DG)
<b>B</b>	/	120 (2*75%DG)	/	160 (2*DG)	160 (2*DG)
<b>a</b>	40 (50% DG)	40 (50% DG)	40 (50% DG)	160 (2*DG)	160 (2*DG)
<b>b</b>	/	80 (2*50%DG)	/	160 (2*DG)	160 (2*DG)
<b>DOSE</b>	<b>0,75</b> <b>0,50</b>	<b>0,75</b> <b>0,50</b>	<b>0,75</b> <b>0,50</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

La durata del test, invece di essere di 21 giorni come definito dalle linee guida per i test cronici, è stata di 13 giorni visto che lo scopo principale era quello di individuare le condizioni che evitassero lo sviluppo di individui maschi nella prima settimana.

### 3.3.1 Determinazione del carbonio organico totale

Con lo scopo di verificare se l'alimentazione fornita agli individui sottoposti a saggio fosse conforme agli standard definiti dal metodo OECD 211, si è valutata la concentrazione del carbonio organico nelle sospensioni di alghe e di lievito utilizzate.

Per quanto riguarda le alghe si è valutata, tramite conteggio al microscopio con la camera di Bürker, la densità (cellule/mL) di un'aliquota di sospensione preparata come descritto al paragrafo 3.1. Parte della sospensione rimanente, circa 20 mL, è stata utilizzata per la determinazione del peso secco delle alghe. Per fare ciò, come prima cosa, filtri calcinati di porosità di 0,7 µm, tali che fossero adeguati alle dimensioni molto piccole dall'alga unicellulare utilizzata, sono stati lavati con acqua distillata per eliminare ogni possibile traccia di carbonio, e posizionati in una stufa, alla temperatura di 105 °C. In particolare si prelevano 3 filtri dalla stufa e si posizionano in un essiccatore contenente sali necessari per l'eliminazione dell'umidità. I filtri a temperature molto alte non hanno un peso stabile per cui hanno bisogno di qualche minuto per raffreddarsi. Il passaggio seguente è stato quello di pesare ad uno ad uno i filtri. Quindi, utilizzando un apparato filtratore, si sono filtrati 10 mL di sospensione di alghe sul primo filtro e, constatato che era più del necessario, 5 mL sul secondo e sul terzo. I filtri utilizzati poi sono stati riposizionati nella stufa finché non è stato

raggiunto un peso stabile, solitamente ciò avviene dopo circa un ora. In seguito sono trasportati, tramite essiccatore, e poi di nuovo pesati.

I restanti 95 mL di soluzione di alghe sono stati utilizzati per l'analisi elementare. Si è proceduto con la centrifugazione della sospensione di alghe dividendo l'aliquota in parti uguali in due tubi da centrifuga. Questi sono stati posizionati in un rotore in modo speculare per far sì che la centrifugazione avvenisse in modo bilanciato. La centrifuga è stata azionata per 15 minuti ad una velocità di 5000 RPM, dopo di che era visibile un completo deposito dell'alga e il surnatante, che è stato eliminato, completamente trasparente. I due tubi sono stati poi inseriti nel congelatore a -20 °C. Il pellet così ottenuto, ancora congelato, è stato inserito in un liofilizzatore per una notte.

Per quanto riguarda il lievito si sono eseguite analoghe operazioni a quelle effettuate per le alghe: un tubo da centrifuga vuoto è stato pesato e in seguito riempito con 1 g di lievito tal quale, infine congelato e liofilizzato.

Cinque campioni sono stati poi analizzati dall'analizzatore elementare CHN, uno strumento in grado di determinare quantitativamente gli elementi chimici presenti in un campione. Il nome deriva dai tre elementi primari misurati con il dispositivo: carbonio (C), idrogeno (H) e azoto (N). Può anche essere misurata la concentrazione di zolfo (S) e ossigeno (O). L'analizzatore utilizza un processo di combustione per abbattere le sostanze in composti semplici che poi vengono misurati. Per procedere con l'analisi si sono prelevati da ogni campione 2-3 mg riportando il peso esatto. I campioni sono introdotti, insieme agli standard noti e al bianco, tramite capsule di alluminio nello strumento in modo da determinarne il contenuto.

### 3.4 Test cronici con singoli farmaci

Prima di valutare gli effetti di miscele binarie di fluoxetina e di propranololo è stata saggiata la tossicità cronica su *D. magna* dei due farmaci singolarmente. Il test è stato condotto seguendo le indicazioni, sostanzialmente equivalenti, dei protocolli ISO 10706 (ISO, 2000) e OECD 211 (OECD, 2008). Lo scopo è di valutare l'effetto di una sostanza sulla capacità riproduttiva di *D. magna*. Inoltre i test eseguiti hanno avuto carattere di "range finding", ossia sono stati il punto di partenza che ha permesso di definire quale sia l'intervallo di

concentrazione di farmaci più opportuno da utilizzare nell'esecuzione dei test cronici con miscele binarie.

Il test aveva una durata di 21 giorni e prevede l'esposizione di individui con età inferiore a 24 ore, ottenuti secondo le modalità descritte nel paragrafo 3.2, alla sostanza in esame (proveniente da una soluzione stock di concentrazione 0,1 g/L effettuata con acqua di allevamento) sciolta con acqua di coltura e alimenti. Il regime alimentare per ogni singola *Daphnia* per i primi tre giorni del test è stato del 75% della dose giornaliera fornito ogni giorno (alghe:  $0,937 \cdot 10^8$  cell/L/day, lievito: 60 mg/L), mentre dal quarto giorno si è fornito il doppio della dose giornaliera a giorni alterni (alghe:  $2,5 \cdot 10^8$  cell/L, lievito: 160 mg/L). Questo regime alimentare è stato scelto sulla base dei risultati dell'esperimento descritto al paragrafo 3.3.

Secondo le linee guida i test cronici prevedono almeno cinque concentrazioni della sostanza da testare con un fattore di separazione non maggiore di 3,2. Inoltre questo test deve essere condotto in range di concentrazioni che, preferibilmente, non dovrebbero includere concentrazioni con un effetto statisticamente significativo sulla sopravvivenza degli adulti, poiché altrimenti diventerebbe anche un test di mortalità e richiederebbe una più complessa analisi statistica. Infine è necessario che la concentrazione massima sia maggiore dell'EC50 ipotizzato, in modo da non escludere dati necessari all'analisi. Tenendo conto di queste indicazioni, per ogni test sono state definite cinque o sei concentrazioni crescenti del farmaco in esame e un controllo con solo acqua di allevamento. In totale i trattamenti effettuati sono 6 per il propranololo e 7 per la fluoxetina, ognuno con 5 repliche, in beacker da 100 mL contenenti una soluzione di 50 mL. Il test si svolge secondo le modalità definite dal paragrafo 3.3.

Sono stati eseguiti due esperimenti successivi per ciascun farmaco. Nella tabella 3.3 è illustrato il disegno sperimentale utilizzato per i due test cronici con propranololo e per i due con fluoxetina.

**Tabella 3.3 Range di concentrazioni di propranololo e fluoxetina applicate ai test cronici.**

	Concentrazioni mg/L						
<b>Propranololo</b>	0,00	0,25	0,42	0,71	1,19	2,00	
<b>Fluoxetina</b>	0,00	0,03	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80

Al termine del test è stato valutato il numero totale dei piccoli vivi prodotti da ciascun individuo riproduttore sopravvissuto fino alla fine del test, mentre la prole nata da adulti che erano morti durante il test non è stata considerata nei risultati finali. Inoltre è stata riportata la sopravvivenza degli organismi riproduttori e il giorno di produzione della prima schiusa.

Secondo l'OECD il test si poteva considerare valido se la mortalità degli organismi riproduttrici nei controlli è minore o uguale al 20%, e se il numero medio di piccoli vivi prodotti per *Daphnia* (sopravvissuta fino alla fine del test) era maggiore o uguale a 60.

### 3.5 Test cronici con miscele di farmaci

L'ultima fase sperimentale è consistita in un esperimento che ha valutato gli effetti di miscele di propranololo e fluoxetina sulla riproduzione di *D. magna*.

Il disegno sperimentale si è basato sulle concentrazioni, espresse in unità tossiche (UT), ossia dal rapporto tra la concentrazione in mg/L della sostanza e il suo EC50 in mg/L. Quest'ultimo è stato ottenuto, per ciascuno dei due farmaci saggiati, come media degli EC50 ottenuti nei test precedentemente svolti sui singoli farmaci separatamente (paragrafo 3.4). Per ogni miscela le unità tossiche totali sono la somma delle unità tossiche di ogni farmaco.

Nella tabella 3.4 viene illustrato il disegno sperimentale che consisteva in 26 trattamenti: 25 miscele di propranololo e fluoxetina a diverse concentrazioni, ciascuna con 4 repliche, e un controllo, senza farmaci, con 10 repliche.

Le miscele sono state preparate in modo da avere 5 diverse concentrazioni, in termini di unità tossiche totali, disposte in successione geometrica: 0,5; 1,71; 1; 1,41; 2 UT.

Per ciascuna di queste concentrazioni totali sono state preparate 5 miscele in cui propranololo (P) e fluoxetina (F) contribuivano in percentuale diversa alle UT totali della miscela: 100% P - 0% F; 75% P - 25% F; 50% P - 50% F; 25% P - 75% F; 0% P - 100% F).

**Tabella 3.4** Concentrazioni di propranololo e fluoxetina nelle 25 miscele saggiate. Nella parte superiore le concentrazioni sono espresse in unità tossiche, nella parte inferiore in mg/L. In ogni colonna sono disposte le miscele con la stessa concentrazione totale, in termini di unità tossiche (le UT aumentano andando da sinistra a destra). In ogni riga sono disposte le miscele con la stessa percentuale di ciascun farmaco (andando dall'alto al basso la percentuale di propranololo diminuisce, quella di fluoxetina aumenta).

Propranololo (UT)	0,50	0,71	1,00	1,41	2,00	<b>100% Propranololo</b>
Fluoxetina (UT)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0% Fluoxetina</b>
<b>TOTALE (UT)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,71</b>	<b>1,00</b>	<b>1,41</b>	<b>2,00</b>	
Propranololo (UT)	0,38	0,53	0,75	1,06	1,50	<b>75% Propranololo</b>
Fluoxetina (UT)	0,13	0,18	0,25	0,35	0,50	<b>25% Fluoxetina</b>
<b>TOTALE (UT)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,71</b>	<b>1,00</b>	<b>1,41</b>	<b>2,00</b>	
Propranololo (UT)	0,25	0,35	0,50	0,71	1,00	<b>50% Propranololo</b>
Fluoxetina (UT)	0,25	0,35	0,50	0,71	1,00	<b>50% Fluoxetina</b>
<b>TOTALE (UT)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,71</b>	<b>1,00</b>	<b>1,41</b>	<b>2,00</b>	
Propranololo (UT)	0,13	0,18	0,25	0,35	0,50	<b>25% Propranololo</b>
Fluoxetina (UT)	0,38	0,53	0,75	1,06	1,50	<b>75% Fluoxetina</b>
<b>TOTALE (UT)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,71</b>	<b>1,00</b>	<b>1,41</b>	<b>2,00</b>	
Propranololo (UT)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0% Propranololo</b>
Fluoxetina (UT)	0,50	0,71	1,00	1,41	2,00	<b>100% Fluoxetina</b>
<b>TOTALE (UT)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,71</b>	<b>1,00</b>	<b>1,41</b>	<b>2,00</b>	

Propranololo (mg/L)	0,369	0,522	0,739	1,045	1,478
Fluoxetina (mg/L)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>TOTALE (mg/L)</b>	<b>0,369</b>	<b>0,522</b>	<b>0,739</b>	<b>1,045</b>	<b>1,478</b>
Propranololo (mg/L)	0,277	0,392	0,554	0,784	1,108
Fluoxetina (mg/L)	0,030	0,042	0,060	0,084	0,119
<b>TOTALE (mg/L)</b>	<b>0,307</b>	<b>0,434</b>	<b>0,614</b>	<b>0,868</b>	<b>1,228</b>
Propranololo (mg/L)	0,185	0,261	0,369	0,522	0,739
Fluoxetina (mg/L)	0,060	0,084	0,119	0,169	0,238
<b>TOTALE (mg/L)</b>	<b>0,244</b>	<b>0,346</b>	<b>0,489</b>	<b>0,691</b>	<b>0,977</b>
Propranololo (mg/L)	0,092	0,131	0,185	0,261	0,369
Fluoxetina (mg/L)	0,089	0,126	0,179	0,253	0,358
<b>TOTALE (mg/L)</b>	<b>0,182</b>	<b>0,257</b>	<b>0,364</b>	<b>0,514</b>	<b>0,727</b>
Propranololo (mg/L)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Fluoxetina (mg/L)	0,119	0,169	0,238	0,337	0,477
<b>TOTALE (mg/L)</b>	<b>0,119</b>	<b>0,169</b>	<b>0,238</b>	<b>0,337</b>	<b>0,477</b>

Esprimere le concentrazioni come unità tossiche è vantaggioso in quanto permette di standardizzare il sistema. Inoltre permette di avere per 1 UT di propranololo lo stesso effetto di 1 UT di fluoxetina.

A parte il disegno sperimentale appena illustrato, dal punto di vista operativo l'esperimento è stato condotto con la procedura per il test cronico su *D. magna* secondo i protocolli ISO 10706 e OECD 211, già descritta al paragrafo 3.4.

### 3.6 Analisi dati

#### 3.6.1 Test con singole sostanze

L'elaborazione statistica delle relazioni concentrazione risposta ottenute sperimentalmente è stata svolta tramite il programma STATISTICA, utilizzando l'analisi di regressione non lineare, in particolare il metodo di stima di Levenberg-Marquardt.

Si è assunto che la relazione concentrazione risposta seguisse il modello logistico:

$$Y = \text{top} / (1 + (c/EC50)^\beta)$$

dove:

- Y = valore dell'endpoint preso in considerazione (numero di individui ancora attivi dopo 24 h di esposizione nei test acuti, numero di nati prodotti durante i 21 giorni di esposizione nei test cronici);
- c = concentrazione di sostanza tossica (bicromato di potassio, propranololo o fluoxetina a seconda dei diversi test);
- $\beta$  = parametro di pendenza;
- top = massimo valore possibile dell'endpoint, che si verifica in assenza di sostanza tossica, cioè nelle condizione del trattamento di controllo;
- EC50 = concentrazione di sostanza tossica che provoca una riduzione al 50% rispetto al valore massimo dell'endpoint; rappresenta il parametro più utilizzato in ecotossicologia per riassumere in un valore unico la relazione concentrazione risposta ed esprimere la tossicità di una sostanza o di un campione.

### 3.6.2 Test cronici con miscele di farmaci

La relazione tra risposta biologica e concentrazioni di propranololo e fluoxetina nelle miscele è stata analizzata utilizzando l'approccio MixTox (Jonker et al., 2005) i cui principi sono stati illustrati al paragrafo 1.3.

In particolare è stato utilizzata la cartella di lavoro Microsoft Excel MixToxModules che implementa il metodo per miscele binarie ed è liberamente disponibile on-line alla pagina web [www.ceh.ac.uk/products/stats/MixtureToxicity-AnalysisTools.html](http://www.ceh.ac.uk/products/stats/MixtureToxicity-AnalysisTools.html).

Questo ha permesso di stimare i parametri dei diversi modelli mediante la funzione Solver di Excel, che utilizza metodi iterativi. Tramite il test del  $\chi^2$  è stato inoltre selezionato il modello più adatto a spiegare i dati osservati.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Test acuto su tossico di riferimento (dicromato di potassio)

Il numero di individui ancora attivi in ciascun beacker dopo 24 h di esposizione in funzione della concentrazione di bicromato di potassio è riportato in figura 4.1. Nella stessa figura è mostrata anche la curva logistica parametrizzata sui dati sperimentali. I dati ben si adattano al modello e i punti sperimentali si distribuiscono quasi completamente in corrispondenza della curva. In corrispondenza delle prime due concentrazioni saggiate non si osserva alcun individuo immobilizzato; segue un intervallo di concentrazione in cui il numero di immobilizzati aumenta rapidamente per arrivare al 100 % di immobilizzazione a partire da 1,93 mg/L.

L'EC50 stimato è di 1,42 mg/L con un intervallo di confidenza al 95 % di 1,38 - 1,45. Il valore di EC50 calcolato rientra nel range di 0,60 – 1,70 definito dal protocollo ISO 6341 (1996).

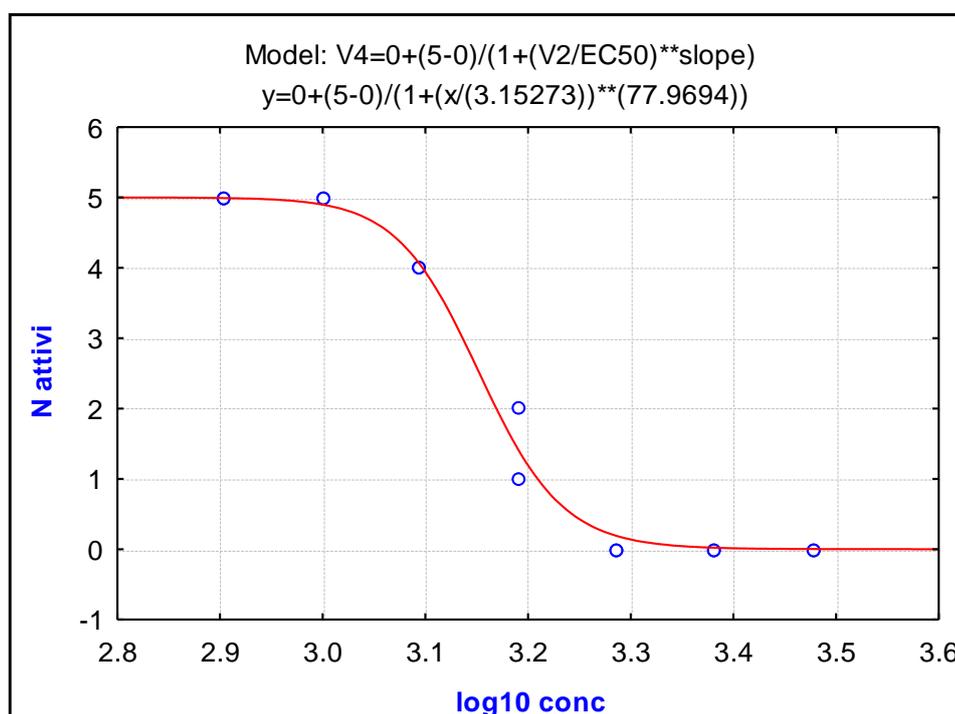


Figura 4.1 Test acuto con dicromato di potassio: relazione tra il numero di individui attivi in ciascun beacker dopo 24 ore e il logaritmo in base 10 delle concentrazione della sostanza testata in  $\mu\text{g/L}$ . I punti rappresentano i dati sperimentali mentre la linea sigmoide continua rappresenta la curva logistica parametrizzata sulla base dei dati e utilizzata per la stima dell'EC50.

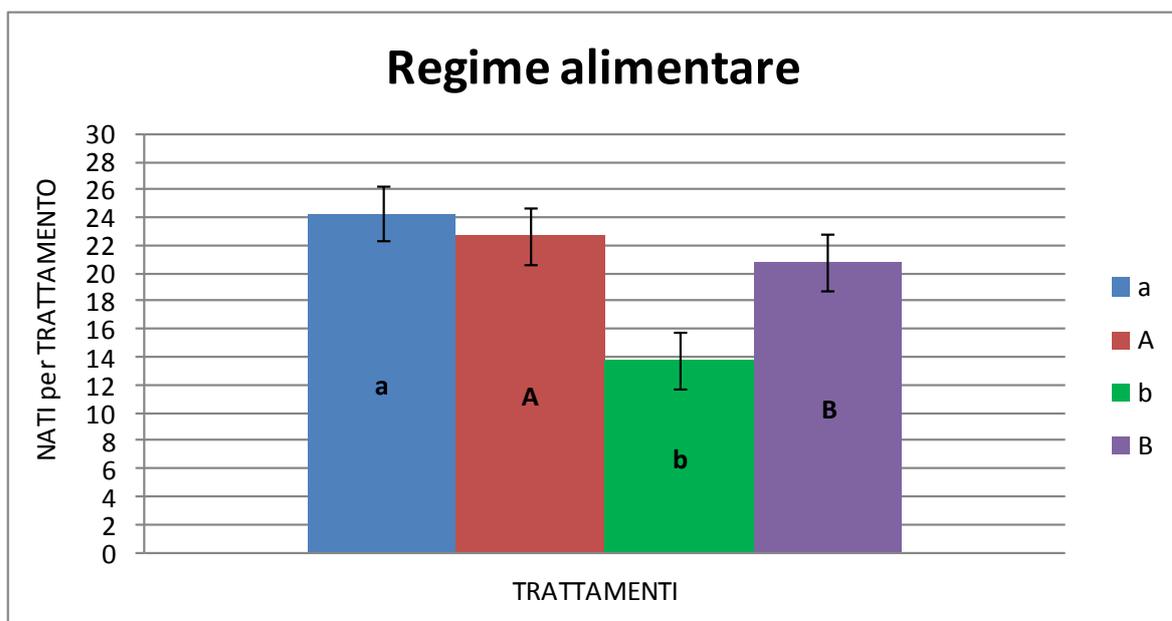
## 4.2 Test per la determinazione del regime alimentare

I risultati, riportati nella tabella 4.1, mostrano che i maschi sono presenti esclusivamente nel trattamento *B* e *b*, per cui entrambi sono sicuramente esclusi come regime alimentare da adottare nei successivi test.

La figura 4.2, mostra il numero medio di nati prodotti da ogni femmina in ciascun trattamento. I trattamenti *a* e *A* risultano avere un numero maggiore di nati, in particolare *a* ha un valore leggermente più alto; queste differenze però non risultano statisticamente significative se valutate con il test dell'analisi della varianza. Per i successivi test cronici si è deciso di adottare il regime alimentare *A*, in quanto non ha causato la comparsa di maschi e ha prodotto un numero di neonati abbastanza alto, anche se minore di *a*. Il regime *A* è stato preferito rispetto ad *a* poiché si è ritenuto di fornire agli individui saggiati nei primi giorni di esposizione una quantità di alimento che non fosse troppo bassa rispetto a quella fornita a partire dal quarto giorno. Considerato che in questo esperimento è stato valutato il numero di neonati prodotti in un tempo più breve rispetto a quello standard, si è ritenuto che questo dato non fosse particolarmente rilevante nella selezione del regime alimentare. Come già indicato, inoltre, la differenze osservate non sono risultate statisticamente significative.

**Tabella 4.1** Nella tabella sono sintetizzati i risultati dei nati, morti e maschi per tipologia di trattamento.

Trattamenti	N° nati medio	N° maschi	N° morti
<b>a</b>	24,30	0	0
<b>A</b>	22,70	0	0
<b>b</b>	13,78	<b>1</b>	0
<b>B</b>	20,83	<b>3</b>	1



**Figura 4.2** Numero medio di neonati prodotti da ogni femmina in ciascuno dei quattro regimi alimentari confrontati. Le barre d'errore rappresentano l'errore standard medio in funzione dei trattamenti forniti durante il test.

#### 4.3 Determinazione del carbonio organico totale

Lo scopo dell'analisi, come già accennato in precedenza, era di verificare se il regime alimentare fornito agli organismi oggetto dei test si attenesse al protocollo OECD 211 (2008) seguito che definisce che esse devono essere alimentate con una quantità di carbonio organico totale nel range di 0,1 - 0,2 mg C/*Daphnia*/day.

I risultati ottenuti dal calcolo del peso secco e dall'analisi elementare (CHN) per le alghe e lievito sono riportate nella tabella sottostante (Tabella 4.2):

**Tabella 4.2** Calcolo del peso secco medio di alghe e lievito ottenuto tramite il processo di liofilizzazione e calcolo della percentuale di carbonio contenuta in entrambi utilizzando il CHN.

	PESO secco medio	% CARBONIO
<b>Alghe</b>	$1,785 * 10^{-11}$ g/cell	55,36
<b>Lievito</b>	0,316 g	48,10

Sulla base dei dati ricavati si è verificata sia la quantità di carbonio fornita tramite le alghe sia quello fornita tramite il lievito. La somma dei risultati ha fornito il valore totale di carbonio somministrato a una *Daphnia* in un giorno (Tabella 4.3).

**Tabella 4.3** Quantità di carbonio fornita ogni giorno per *Daphnia* e confronto con il range stabilito dal protocollo OECD 211 (2008).

	<b>Carbonio (mg/individuo/giorno)</b>
<b>Alghe</b>	0,062
<b>Lievito</b>	0,061
<b>Totale</b>	<b>0,123</b>
<b>Intervallo indicato da OECD 211</b>	<b>Da 0,1 a 0,2</b>

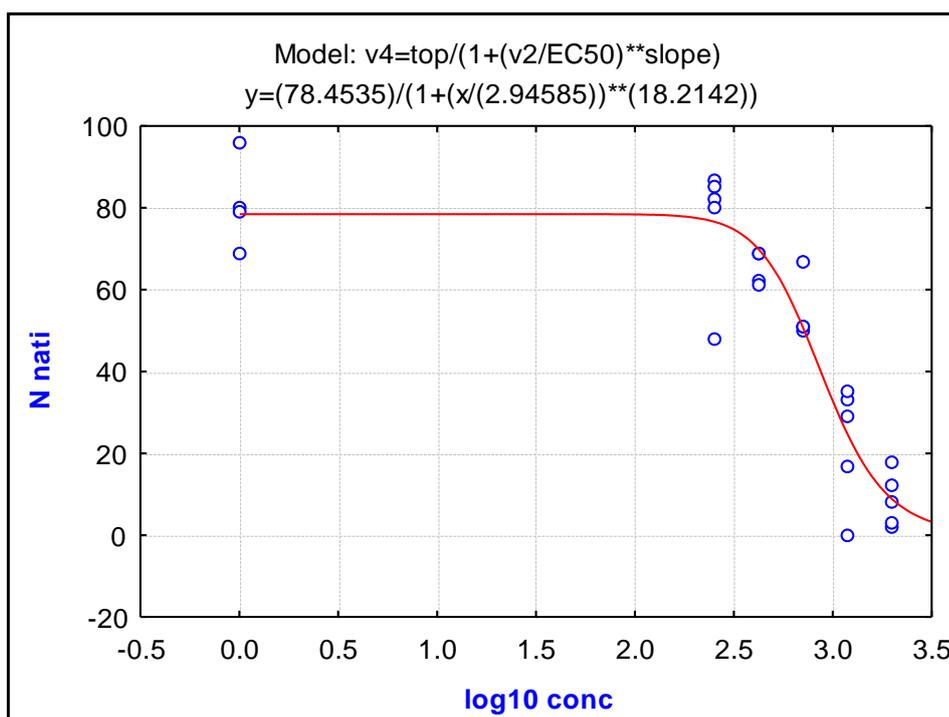
I risultati mostrano che la quantità di carbonio fornito come alghe unicellulari e lievito rientra nel range stabilito dal protocollo, e contribuisce alla conferma che il regime alimentare selezionato con il test effettuato in precedenza (vedi paragrafo 4.2) è quello più idoneo.

## 4.4 Test cronici con singoli farmaci

### 4.4.1 Test cronico con propranololo

Il numero di individui nati in ciascun beacker dopo 21 giorni di esposizione in funzione della concentrazione di propranololo è riportato nelle figure 4.3 e 4.4. Nella stesse figure è mostrata anche la curva logistica parametrizzata sui dati sperimentali.

Le due curve risultano simili, anche se il numero di nati nella maggior parte delle concentrazioni risulta maggiore nel primo test probabilmente a causa della variabilità dei singoli organismi, ma in entrambi i test all'aumentare della concentrazione si ha una diminuzione del numero di nati medio per *Daphnia*. Inoltre nel primo test la pendenza della curva (slope) risulta maggiore (Tabella 4.4).



**Figura 4.3** Primo test cronico con propranololo: relazione tra il numero di individui nati in ciascun beacker dopo 21 giorni e il logaritmo in base 10 delle concentrazioni della sostanza testata in µg/L. I punti rappresentano i dati sperimentali mentre la linea sigmoide continua rappresenta la curva logistica parametrizzata sulla base dei dati e utilizzata per la stima dell'EC50.

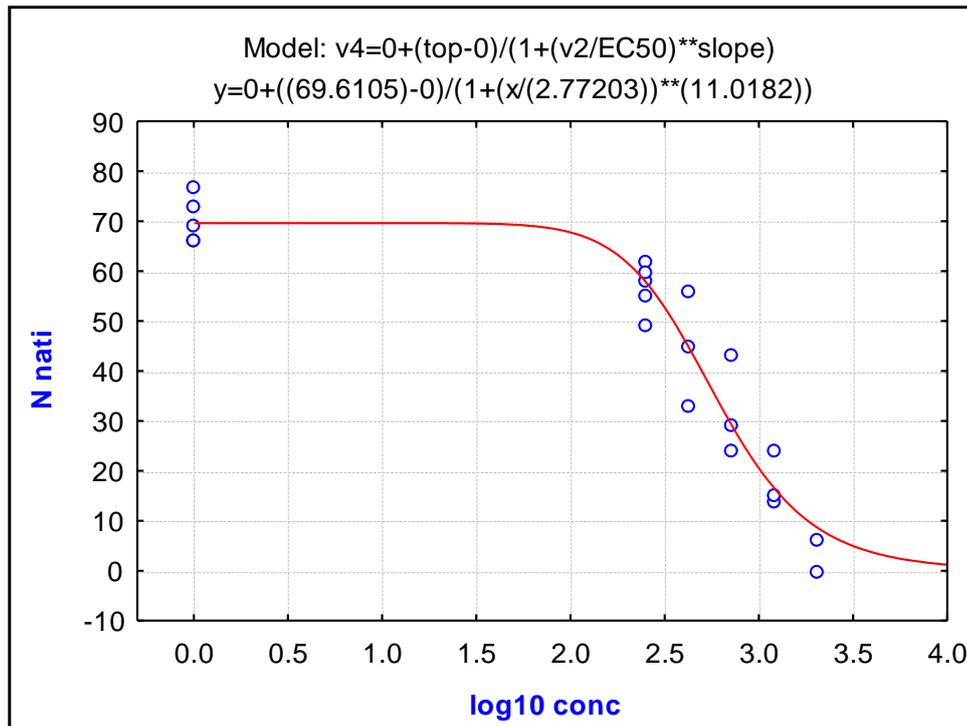


Figura 4.4 Secondo test cronico con propranololo: relazione tra il numero di individui nati in ciascun beacker dopo 21 giorni e il logaritmo in base 10 delle concentrazioni della sostanza testata in  $\mu\text{g/L}$ . I punti rappresentano i dati sperimentali mentre la linea sigmoide continua rappresenta la curva logistica parametrizzata sulla base dei dati e utilizzata per la stima dell'EC50.

	Stima	Intervallo di confidenza al 95 %	
		limite inferiore	limite superiore
<b>Test 1</b>			
Top (N°neonati)	75	65	86
Slope $\beta$	20	10	30
EC50 (mg/L)	0,93	0,75	1,14
<b>Test 2</b>			
Top (N°neonati)	70	63	76
Slope $\beta$	11	8	14
EC50 (mg/L)	0,59	0,48	0,73
<b>Media dei due test</b>			
EC50 (mg/L)	0,74		

Tabella 4.4 Parametri del modello logistico stimati utilizzando la regressione non lineare sulla base della relazione concentrazione risposta sperimentale per i due test cronici sul propranololo.

Sulla base dei dati è stato calcolato l'EC50 e la loro media (Tabella 4.4), che presenta per entrambi un intervallo di confidenza abbastanza ristretto. La media degli EC50 verrà utilizzata per il calcolo delle concentrazioni espresse come unità tossiche totali per il test con le miscele di farmaci, mentre i valori della pendenza della curva (slope) e il valore più alto osservato (top) saranno utilizzati come valori di partenza per l'analisi con il MixTox.

Entrambi i test effettuati sono ritenuti validi in quanto rispettano le condizioni definite dalle linee guida dell'OECD 211 (2008) (paragrafo 3.4).

#### 4.4.2 Test cronico con fluoxetina

Il numero di individui nati in ciascun beacker dopo 21 giorni di esposizione in funzione della concentrazione di fluoxetina è riportato nelle figure 4.5 e 4.6. Nella stesse figure è mostrata anche la curva logistica parametrizzata sui dati sperimentali.

Come si evince dalle figure le medie dei nati nei due test della fluoxetina rispetto al test con il propranololo non diminuiscono all'aumentare della concentrazione, se non per le concentrazioni più alte di fluoxetina, ma sembrano seguire un andamento diverso perfino con un numero di nati maggiori in presenza di fluoxetina (0,03 mg/L) rispetto al controllo. Queste differenze però non risultano statisticamente significative se valutate con il test dell'analisi della varianza.

In generale, le curve dei due test con fluoxetina sono simili, difatti la pendenza (slope) è di poco differente al contrario del test con il propranololo (Tabella 4.5).

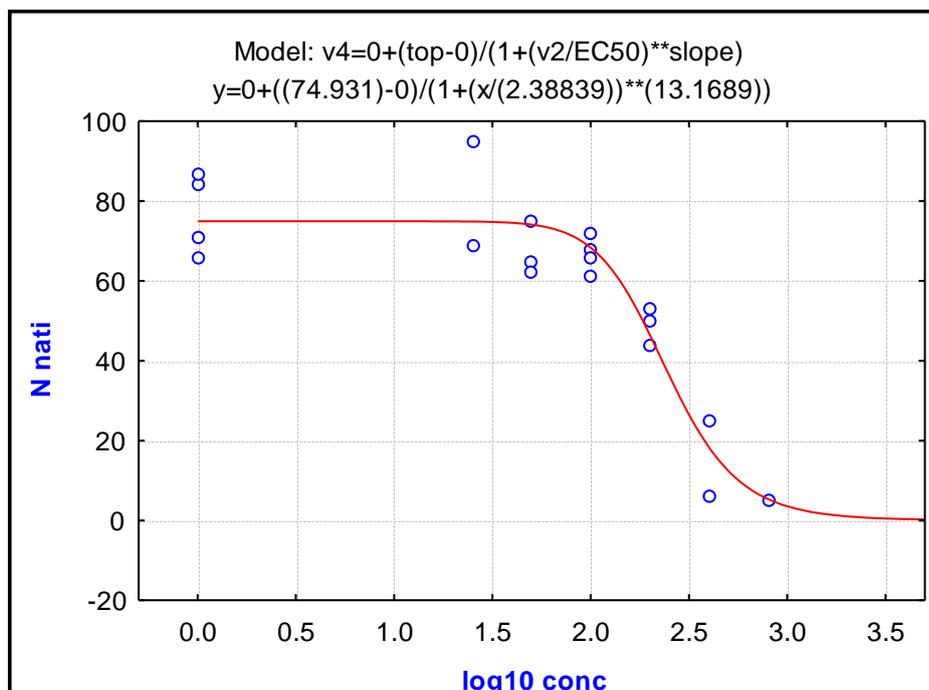


Figura 4.5 Primo test cronico con fluoxetina: relazione tra il numero di individui nati in ciascun beacker dopo 21 giorni e il logaritmo in base 10 delle concentrazioni della sostanza testata in  $\mu\text{g/L}$ . I punti rappresentano i dati sperimentali mentre la linea sigmoide continua rappresenta la curva logistica parametrizzata sulla base dei dati e utilizzata per la stima dell'EC50.

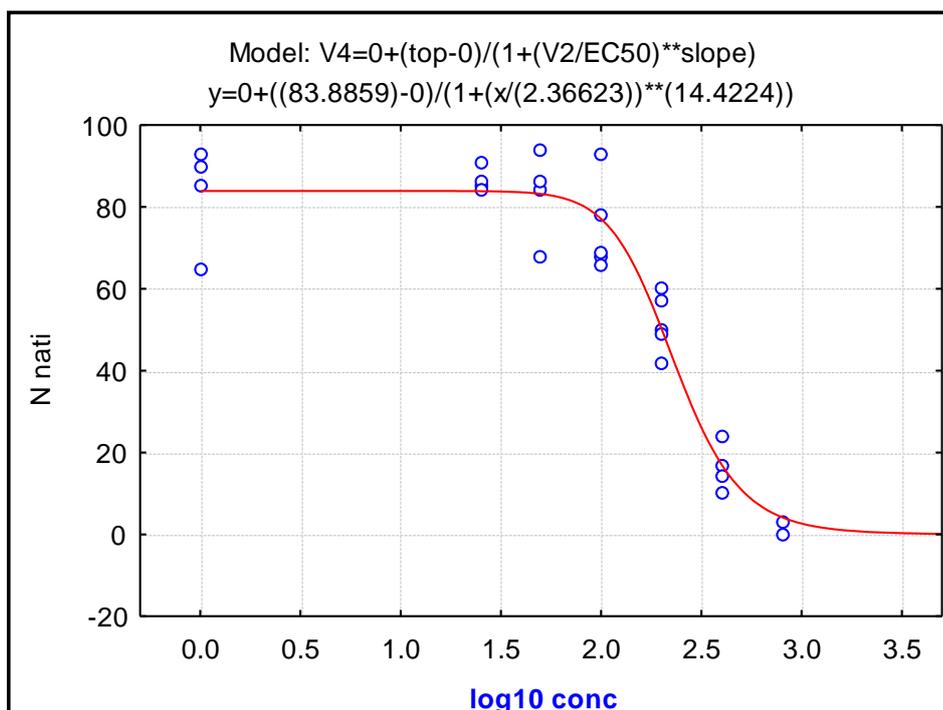


Figura 4.6 Secondo test cronico con fluoxetina: relazione tra il numero di individui nati in ciascun beacker dopo 21 giorni e il logaritmo in base 10 delle concentrazioni della sostanza testata in  $\mu\text{g/L}$ . I punti rappresentano i dati sperimentali mentre la linea sigmoide continua rappresenta la curva logistica parametrizzata sulla base dei dati e utilizzata per la stima dell'EC50.

**Tabella 4.5 Parametri del modello logistico stimati utilizzando la regressione non lineare sulla base della relazione concentrazione risposta sperimentale per i due test cronici sulla fluoxetina.**

	Stima	Intervallo di confidenza al 95%	
		limite inferiore	limite superiore
<b>Test 1</b>			
Top (N°neonati)	75	68	81
Slope $\beta$	13	6	20
EC50 (mg/L)	0,24	0,19	0,31
<b>Test 2</b>			
Top (N°neonati)	84	79	89
Slope $\beta$	14	10	19
EC50 (mg/L)	0,23	0,20	0,27
<b>Media dei due test</b>			
EC50 (mg/L)	0,24		

Nei due test l'EC50 calcolato (Tabella 4.5) presenta valori simili soprattutto rispetto al confronto tra i due EC50 calcolati nel propranololo che presentano una distanza numerica maggiore. L'intervallo di confidenza dell'EC50 della fluoxetina si presenta inoltre piuttosto ristretto. Confrontando i valori degli EC50 dei test effettuati con i due farmaci si può notare che l'EC50 della fluoxetina è quattro volte più basso di quello del propranololo, infatti essi risultano rispettivamente di 0,74 mg/L per il propranololo e 0,24 mg/L per la fluoxetina.

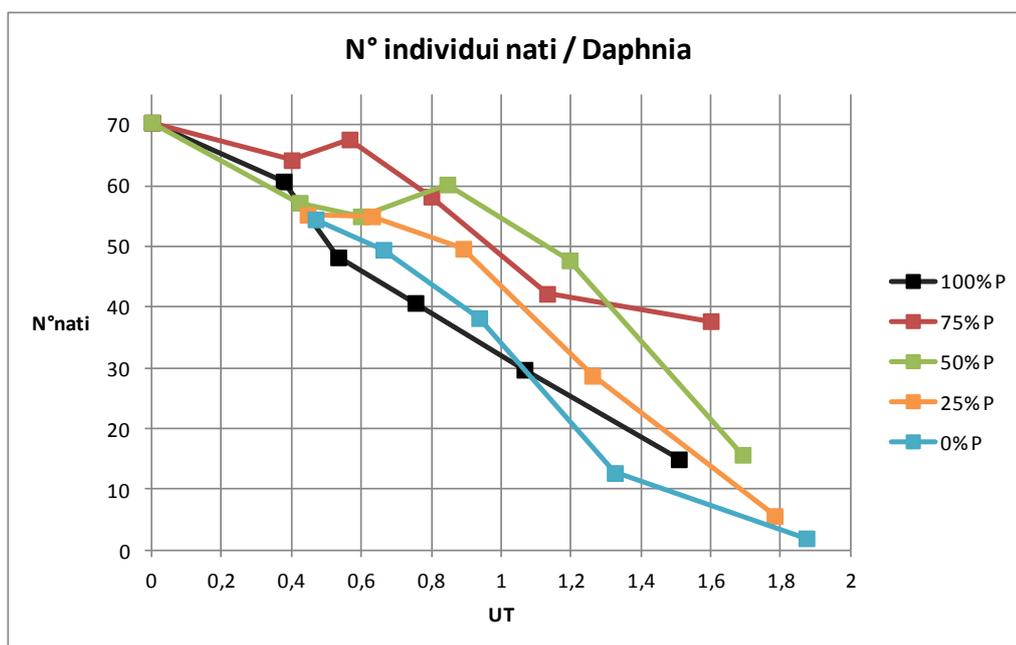
La media degli EC50 verrà utilizzata per il calcolo delle concentrazioni espresse come unità tossiche totali per il test con le miscele di farmaci, mentre i valori della pendenza della curva (slope) e il valore più alto osservato (top) saranno utilizzati come valori di partenza per l'analisi con il MixTox.

Entrambi i test effettuati sono ritenuti validi in quanto rispettano le condizioni definite dalle linee guida dell'OECD 211 (2008) (paragrafo 3.4).

#### 4.5 Test cronici con miscele di farmaci

Il test cronico con miscele di propranololo e fluoxetina prevedeva l'esposizione per 21 giorni degli organismi a diverse unità tossiche costituite da percentuali diverse dei due farmaci in esame.

Nella figura 4.7 sono rappresentati i risultati dei test sperimentali in termini di numero medio di neonati prodotti da una singola *Daphnia* in funzione della concentrazione delle miscele espresse in unità tossiche totali, e della percentuale di propranololo nelle miscele. Il grafico mostra come le linee che rappresentano la relazione concentrazione risposta per i due singoli farmaci (100 % P e 0 % P) siano al di sotto delle linee che rappresentano la relazione concentrazione risposta delle miscele. Ciò sta a significare che, a parità di concentrazione in termini di unità tossiche, per le miscele il numero di nati risulta maggiore che non per le due sostanze da sole. In altri termini, sempre a parità di concentrazione, le miscele sembrano essere meno tossiche dei singoli farmaci.



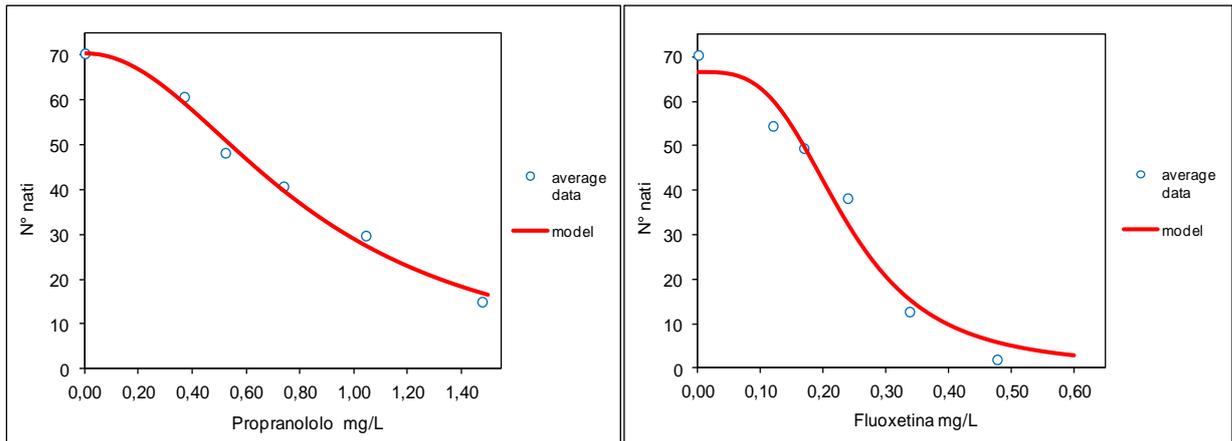
**Figura 4.7** Numero di nati per singola *Daphnia* in funzione della concentrazione delle miscele espresse in unità tossiche. Ogni punto rappresenta la media di quattro repliche sperimentali (10 per la concentrazione 0, cioè per il trattamento di controllo). Le linee di diverso colore rappresentano le diverse percentuali di propranololo nella miscela (la percentuale di fluoxetina è data dal complemento a 100). Le unità tossiche sono calcolate sulla base degli EC50 del propranololo e della fluoxetina stimati con il modello S/A\_DR.

In figura 4.8 e in tabella 4.6 i sono riportati i risultati della prima fase di analisi dei dati mediante l'utilizzo dell'implementazione del MixTox in Excel. Questa fase consiste nell'applicazione del modello logistico ai soli dati relativi a propranololo e fluoxetina non in miscela (100 % P e 0 % P). Come valori iniziali dei parametri sono stati utilizzati quelli ottenuti dai precedenti esperimenti sui singoli farmaci (paragrafo 4.3). A partire da questi valori iniziali la Funzione Solver ha calcolato con metodi iterativi le nuove stime basate sui dati sperimentali. Questi risultati sono indipendenti dalla natura dell'interazione tra le due sostanze, poiché sono ottenuti separatamente per ciascuna delle due sostanze, in assenza dell'altra.

**Tabella 4.6 Applicazione di MixTox al test cronico su miscele di propranololo e fluoxetina, risultati relativi alle due sostanze, ciascuna in assenza dell'altra: parametri del modello logistico stimati utilizzando la regressione non lineare, implementata utilizzando la Funzione Solver di Excel.**

	<b>Propranololo</b>	<b>Fluoxetina</b>
<b>Top (N°nati)</b>	<b>70</b>	<b>66</b>
<b>Slope <math>\beta</math></b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>EC50 (mg/L)</b>	<b>0,84</b>	<b>0,23</b>
<b>SS<sub>res</sub></b>	<b>19</b>	<b>103</b>

Come si può vedere dalle figure i dati sperimentali per il propranololo si adattano meglio al modello logistico, presentano una minore dispersione attorno alla linea continua che rappresenta il modello rispetto a quelli della fluoxetina, difatti il valore di SS<sub>res</sub> per la fluoxetina risulta molto più alto.



**Figura 4.8 Test cronico su miscele di propranololo e fluoxetina, risultati relativi alle due sostanze, ciascuna in assenza dell'altra: relazione tra il numero medi di neonati prodotti da una femmina e la concentrazione di propranololo e fluoxetina. I punti rappresentano i dati sperimentali mentre la linea sigmoide continua rappresenta la curva logistica parametrizzata sulla base dei dati e utilizzata per la stima dell'EC50.**

Successivamente, utilizzando i dati sperimentali relativi sia alle sostanze singole che a tutte le miscele sono stati stimati i parametri per i modelli *concentration addition* di riferimento (CA), con sinergismo o antagonismo (S/A), *dose ratio dependent* (DR) e *dose level dependent* (DL) che sono stati illustrati al paragrafo 1.3. Per il modello CA, come valori iniziali dei parametri utilizzati per il processo iterativo di stima, sono stati utilizzati quelli relativi alle singole sostanze (Tabella 4.6). Per i modelli successivi, come valori iniziali si sono utilizzati quelli precedentemente ottenuti per il modello immediatamente più semplice. Quindi per stimare i parametri del modello S/A si sono usati i valori del modello CA, per il modelli DR e DL quelli del modello S/A

La tabella 4.7 riporta i valori restituiti dall'applicazione del MixTox per ogni modello investigato. Qui si può notare che il valore di  $SS_{res}$  diminuisce nel passare dal modello CA a quello S/A. Inoltre il test del  $\chi^2$  indica che il modello S/A si adatta ai dati in modo significativamente migliore rispetto al modello CA. Il valore di  $SS_{res}$  si riduce ulteriormente sia passando al modello DR che al DL. Il valore di  $SS_{res}$  minore lo troviamo comunque nel modello DR, inoltre il test  $\chi^2$  indica che mentre il miglioramento rispetto al modello CA è significativo sia per DR che per DL, il miglioramento rispetto a S/A è significativo solo in DR. L'applicazione di MixTox ai dati sperimentali indica quindi che il modello che meglio rappresenta i dati sia quello con antagonismo o sinergismo *dose ratio dependent* (DR). Rispetto alla tabella 1.6 del paragrafo 1.3 si può vedere che essendo i valori dei parametri  $a$  e

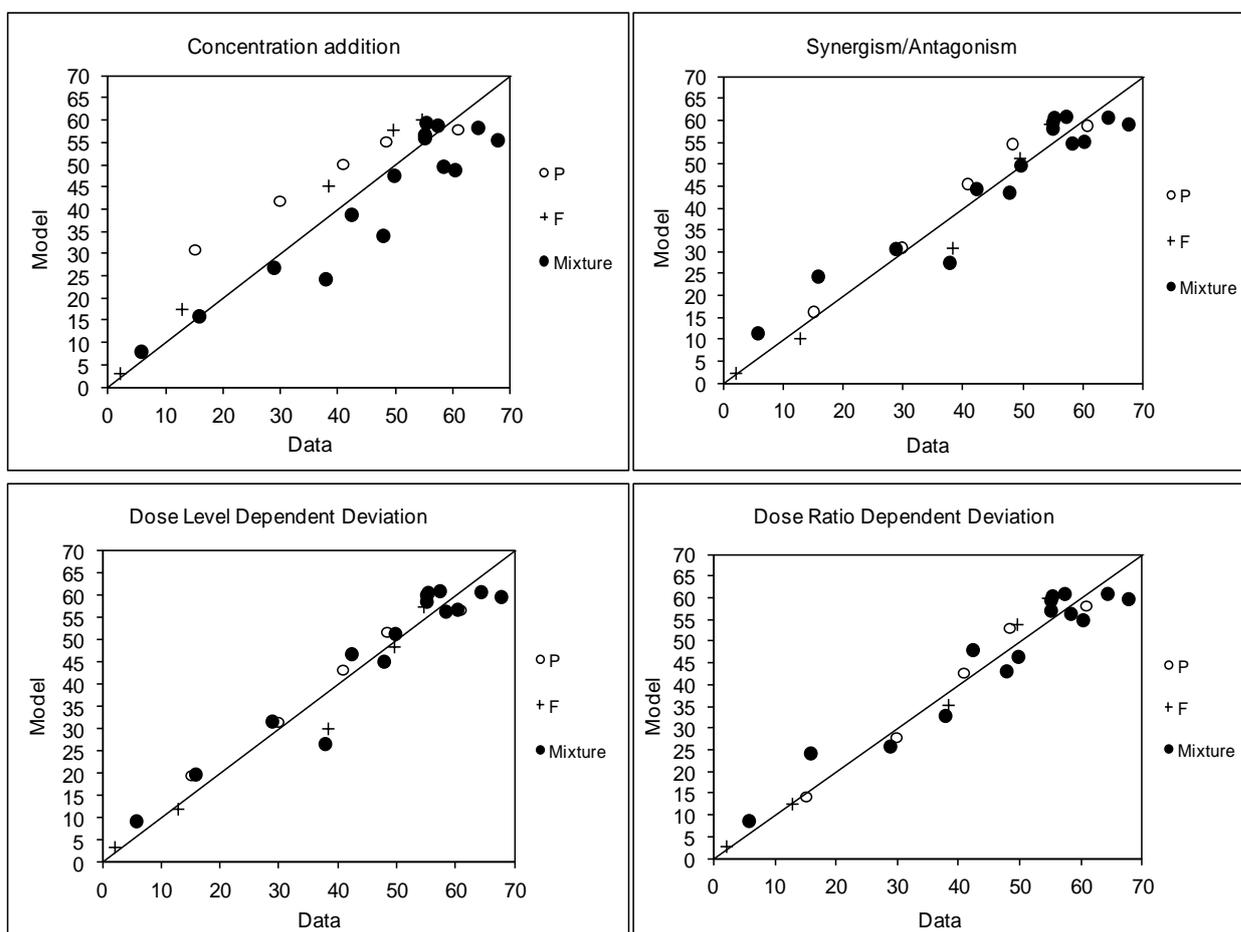
$b$  entrambi maggiori di zero allora si è in presenza di antagonismo, dove  $b > 0$  indica che si ha un grado di antagonismo quando il propranololo rappresenta una percentuale maggiore del totale delle unità tossiche della miscela rispetto alla fluoxetina.

**Tabella 4.7** Output di MixTox applicato agli effetti di miscele di propranololo e fluoxetina sulla riproduzione di *Daphnia magna* (numero di neonati prodotti da un femmina in 21 giorni). Sono riportati i parametri dei modelli e il test per l'individuazione del modello che si adatta maggiormente ai dati sperimentali.

	MODELLI					
	CA	S/A	DR	DL		
<b>Top</b>	60,75	61,59	61,77	61,65		
<b>Slope(P)</b>	2,20	2,98	2,90	2,34		
<b>Slope(F)</b>	5,70	4,67	4,76	3,92		
<b>EC50 (P) mg/L</b>	1,51	1,05	0,98	1,07		
<b>EC50 (F) mg/L</b>	0,29	0,24	0,25	0,24		
<b><math>a</math></b>		1,74	0,29	4,42		
<b><math>b</math></b>			3,09	0,43		
		$a > 0$	$a > 0$	$a > 0$		
			$b > 0$	$0 < b < 1$		
<b>SS<sub>res</sub></b>	1619,43	671,78	522,79	/	585,79	
<b>Test <math>\chi^2</math></b>		<b>CA vs S/A</b>	<b>CA vs DR</b>	<b>S/A vs DR</b>	<b>CA vs DL</b>	<b>S/A vs DL</b>
<b>N=26</b>						
<b>df</b>		1	2	1	2	1
<b>Chi value</b>		22,88	29,40	6,52	26,44	3,56
<b>Chi Test</b>		<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>	<b>0,06</b>
<b><math>\alpha=0,05</math></b>		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05

Nella figura 4.9 sono stati rappresentati i valori previsti dai diversi modelli e i dati osservati sperimentalmente. A conferma di quanto già illustrato, si nota un progressivo miglioramento dell'adattamento del modello ai dati sperimentali a partire da CA, S/A fino DR. Infatti i punti tendono in media ad avvicinarsi alla linea che rappresenta il perfetto accordo tra osservazioni sperimentali e previsioni del modello, passando da un modello all'altro, come del resto già indicato dalla diminuzione dei valori di SS<sub>res</sub>. Inoltre, per quanto riguarda CA i punti che rappresentano le previsioni del modello per le miscele si trovano sistematicamente quasi tutti al di sotto della linea che indica il perfetto accordo. Invece i

punti che rappresentano le previsioni del modello per i singoli farmaci sono quasi tutti al di sopra. Quindi è chiaro che vi è una sovrastima del numero di nati da parte del modello nel caso dei singoli farmaci e una sottostima nel caso delle miscele. Invece nel modello DR i punti sono più uniformemente distribuiti attorno alla linea continua.



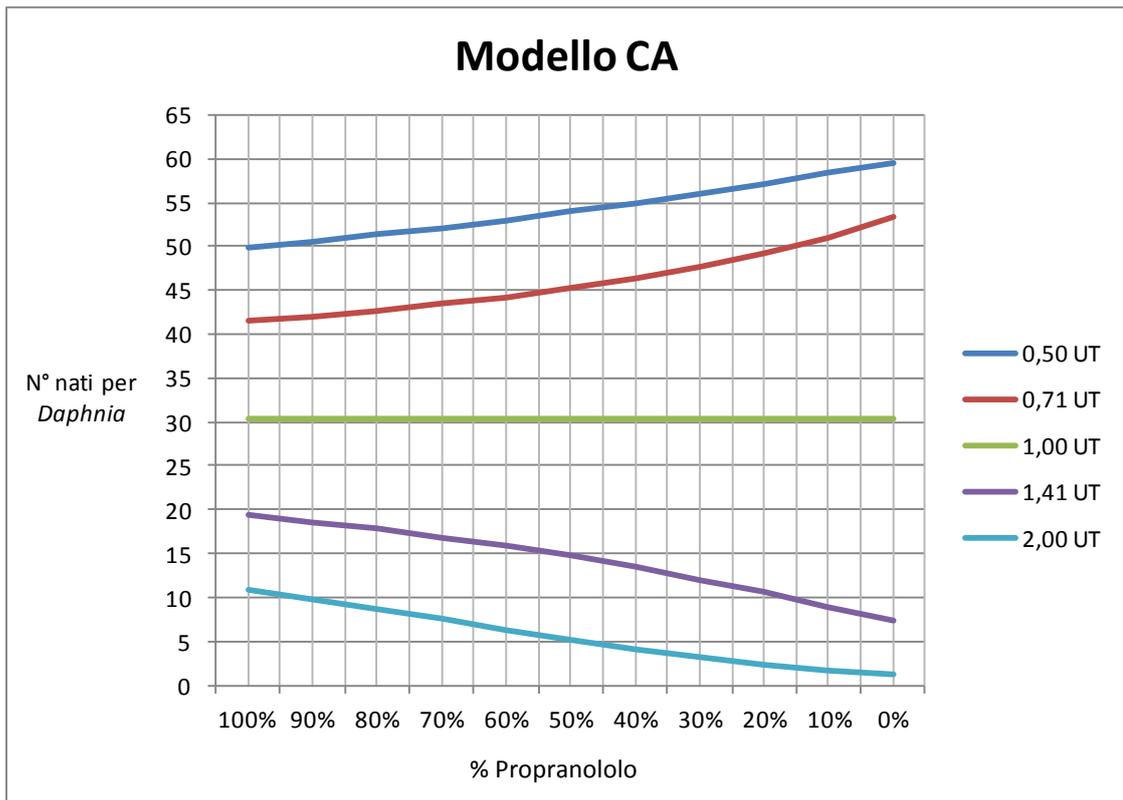
**Figura 4.9** Rappresentazione grafica dei dati previsti dai modelli in funzione dei dati sperimentali con lo scopo di rappresentare la bontà dei vari modelli. P indica la presenza del solo propranololo, F della sola fluoxetina e Mixture le miscele dei due farmaci. La linea che taglia in diagonale i grafici indica la concordanza perfetta tra previsione del modello e osservazione sperimentale.

Per illustrare le differenze tra i modelli alternativi presi in considerazione, nel seguito sono illustrate le previsioni di ciascuno di essi, in termini di numero di neonati prodotti da ciascun individuo, in funzione della percentuale dei due farmaci presente nella miscela e della concentrazione delle miscele in termini di unità tossiche totali.

La figura 4.10 mostra le previsioni del modello *concentration addition* di riferimento (CA), con i parametri stimati sulla base dei presenti risultati sperimentali. Le linee che rappresentano la variazione del numero di nati in funzione della percentuale di propranololo

(e, di conseguenza di fluoxetina) mostra un andamento lineare degli effetti per tutte le concentrazioni della miscela, in termini di unità tossiche totali. In particolare la linea relativa alle miscele con concentrazione pari a 1 UT è perfettamente orizzontale, infatti la linea presenta il medesimo comportamento al variare della miscela e la risposta biologica è sempre pari a 30 nati per *Daphnia*, cioè alla metà del valore del parametro *top*. Questo perché nel modello CA, per definizione, tutte le miscele con concentrazione 1 UT determinano un effetto del 50% rispetto al trattamento di controllo (assenza di entrambe le sostanze tossiche).

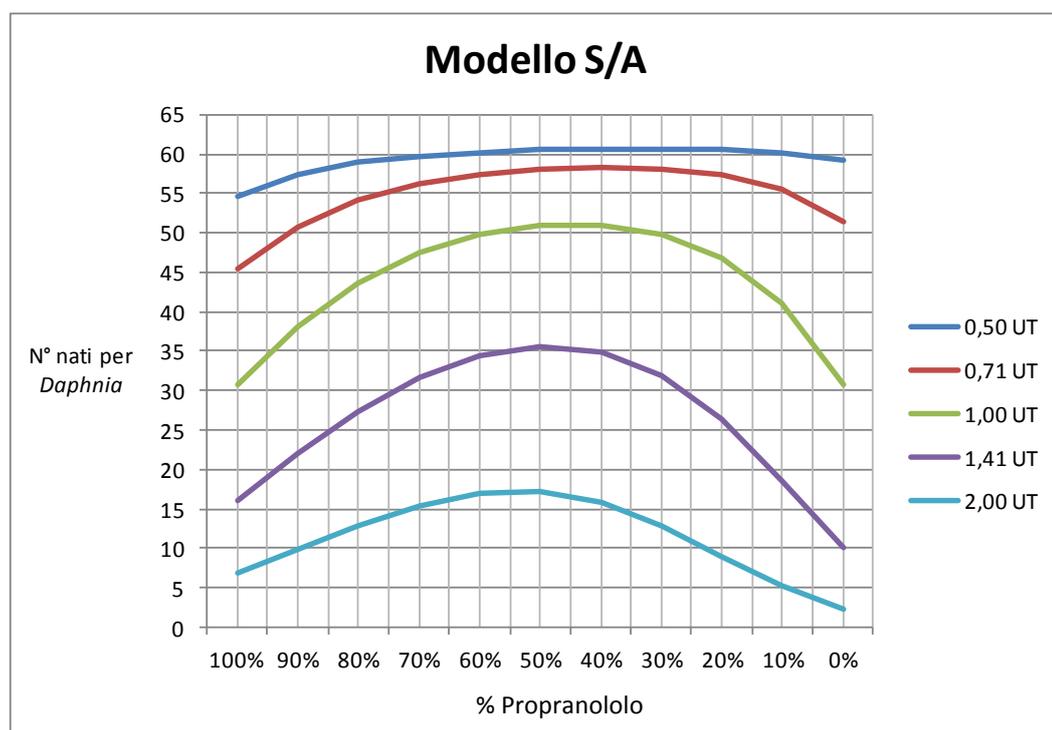
Invece per le miscele con concentrazioni inferiori a 1 UT si può notare come il numero di nati aumenti con l'aumentare della percentuale di fluoxetina nella miscela; per le miscele con concentrazioni inferiori a 1 UT avviene esattamente il contrario. Questo è dovuto al fatto che il valore del parametro di pendenza  $\beta$  è maggiore per la fluoxetina rispetto al propranololo e quindi per concentrazioni maggiori dell'EC50 l'effetto aumenta più rapidamente all'aumentare della concentrazione rispetto al 50%, quindi anche una concentrazione di poco più alta ha un'effetto molto più alto del 50%. Allora per concentrazioni minori dell'EC50 l'effetto diminuisce più rapidamente al diminuire della concentrazione rispetto al 50%, quindi anche una concentrazione di poco più bassa ha un'effetto molto più piccolo del 50%.



**Figura 4.10** Previsione del modello CA con i parametri stimati sulla base dei dati sperimentali: numero medio di nati per individuo in funzione della percentuale di propranololo presente nella miscela (la percentuale di fluoxetina è sempre il complemento a 100). Le linee di diverso colore rappresentano diverse concentrazioni totali della miscela, in termini di unità tossiche.

La figura 4.11 mostra le previsioni del modello di antagonismo (S/A), con i parametri stimati sulla base dei presenti risultati sperimentali. Le linee che rappresentano la variazione del numero di nati in funzione della percentuale di propranololo sono curvilinee con un andamento convesso che risulta più appiattito per le miscele con concentrazioni più elevate e più basse. L'andamento curvilineo indica che, a parità di UT, miscele con diverse percentuali dei due farmaci hanno effetti diversi. Le sostanze pure provocano una maggior riduzione del numero di nati rispetto alle miscele in cui sono presenti entrambi i farmaci. In particolare per le miscele 1 UT, il massimo della curva è esattamente in corrispondenza della miscela al 50%, indicando per questa combinazione la minore riduzione del numero di nati rispetto al controllo.

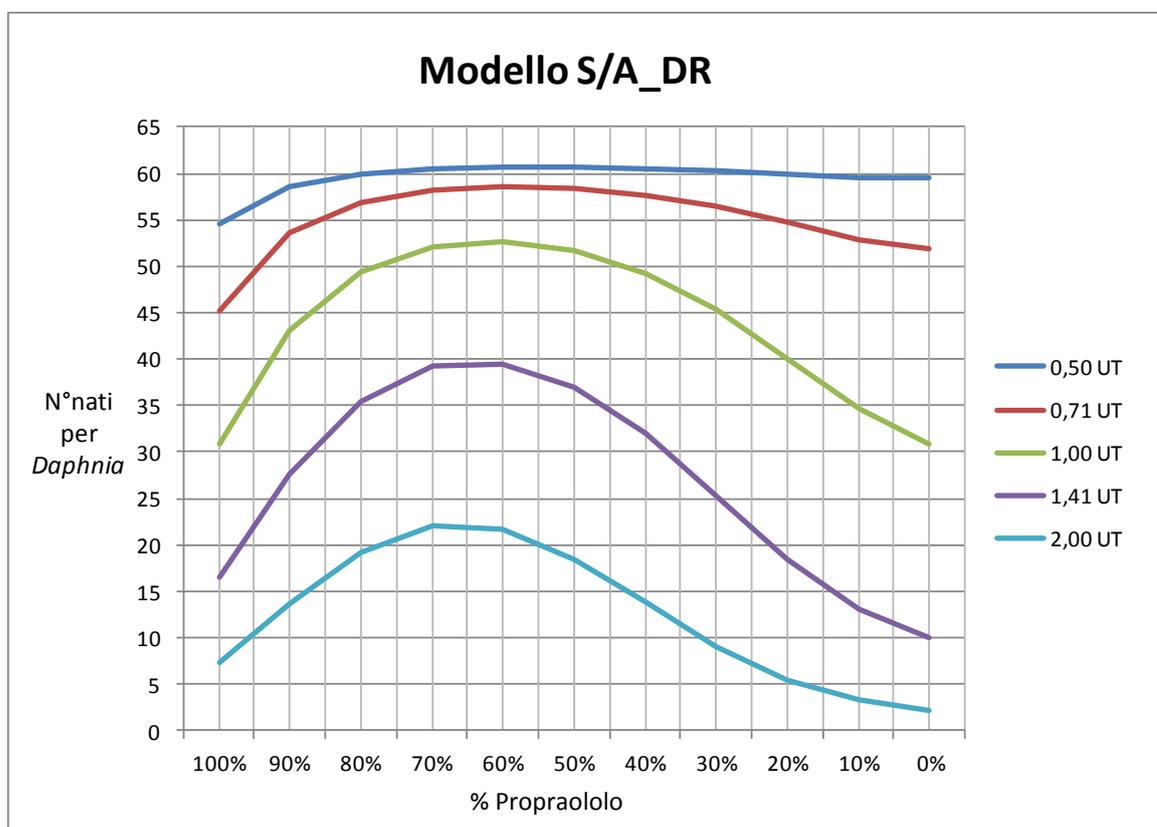
La curva per 1 UT si mantiene al valore di circa 30 nati (metà del valore del parametro *top*) per i singoli farmaci (100 % propranololo e 100 % fluoxetina). Infatti qualunque sia il modo in cui interagiscono le due sostanze, la concentrazione 1 UT di una sostanza, in assenza dell'altra, corrisponde all'EC50.



**Figura 4.11** Previsione del modello S/A con i parametri stimati sulla base dei dati sperimentali: numero medio di nati per individuo in funzione della percentuale di propranololo presente nella miscela (la percentuale di fluoxetina è sempre il complemento a 100). Le linee di diverso colore rappresentano diverse concentrazioni totali della miscela, in termini di unità tossiche.

La figura 4.12 mostra le previsioni del modello *dose ratio dependent* (DR), con i parametri stimati sulla base dei presenti risultati sperimentali. Le linee che rappresentano la variazione del numero di nati in funzione della percentuale di propranololo hanno un andamento simile a quello appena visto per l'antagonismo. Però, la riduzione dell'effetto risulta più accentuata dove vi è una maggior percentuale di propranololo. In particolare la curva 1 UT è asimmetrica e il suo massimo è tra il 60% e il 70% di propranololo, inoltre la convessità della curva è appiattita in corrispondenza delle percentuali più basse di propranololo.

In generale per tutte le curve, e quindi per tutte le concentrazioni, in termini di UT totali, in corrispondenza del 75% di propranololo si ha un maggior numero di nati rispetto al 25 % di propranololo.



**Figura 4.12** Previsione del modello S/A\_DR con i parametri stimati sulla base dei dati sperimentali: numero medio di nati per individuo in funzione della percentuale di propranololo presente nella miscela (la percentuale di fluoxetina è sempre il complemento a 100). Le linee di diverso colore rappresentano diverse concentrazioni totali della miscela, in termini di unità tossiche.

Stabilito che il modello S/A\_DR rappresenta al meglio i dati sperimentali, allora nella figura 4.7 precedentemente illustrata sono rappresentati il numero di nati per singolo individuo in funzione delle unità tossiche totali ricalcolate sulla base delle concentrazioni applicate ai test. Per far ciò si è effettuato il rapporto tra le concentrazioni applicate di ogni singolo farmaco e l'EC50 calcolato dal modello S/A\_DR e infine la somma delle UT in modo tale da ottenere le unità tossiche totali per ogni trattamento.

I grafici della figura 4.13 confrontano direttamente le previsioni dei tre modelli in corrispondenza di diverse concentrazioni delle miscele e mettono in evidenza la forte differenze tra i vari modelli, in particolare tra il modello CA e il modello DR. Infatti il modello DR, identificato come il più corrispondente ai dati sperimentali, risulta molto più simile al modello S/A anche perché è il risultato dell'aggiunta al modello S/A dei parametri  $a$  e  $b$  precedentemente descritti.

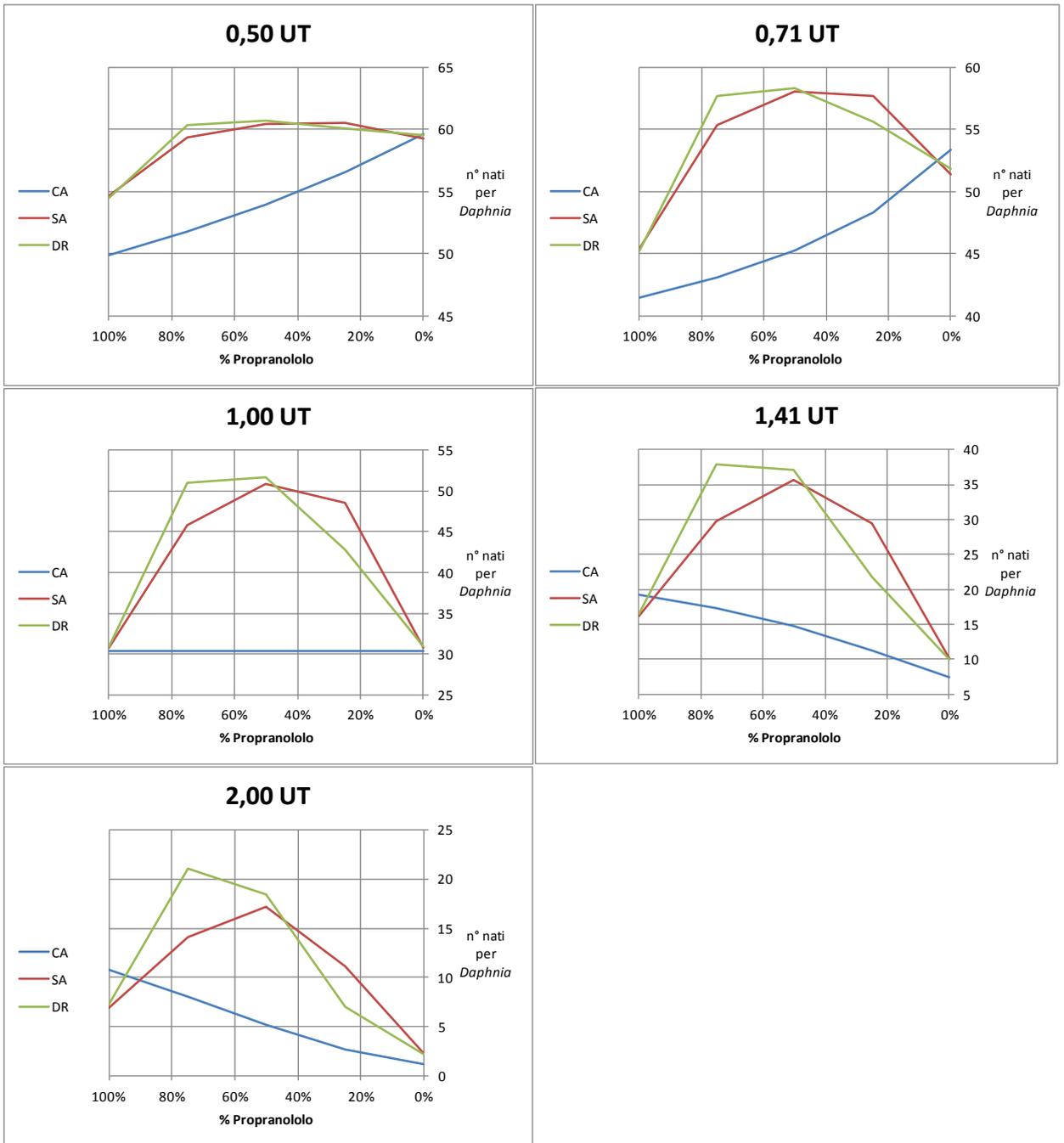


Figura 4.13 Evoluzione dei modelli CA, S/A, S/A\_DR per ogni unità tossica analizzata.

## 5. DISCUSSIONE

L'obiettivo dello studio era quello di verificare gli effetti della miscela binaria costituita dal beta-bloccante propranololo e dall'SSRI fluoxetina sulla riproduzione di *D. magna*.

La prima fase sperimentale consisteva nel verificare i requisiti definiti dai protocolli sui test cronici seguiti attraverso un test acuto con dicromato di potassio e un test cronico per la determinazione del regime alimentare. Il test acuto aveva lo scopo di valutare la sensibilità degli organismi testati attraverso il calcolo dell'EC50 sulle 24 ore che è risultato di 1,42 mg/L. Questo valore rientra pienamente nel range definito dal protocollo ISO 6341 (ISO, 1996) che è di 0,6 - 1,7 mg/L, come del resto i valori ottenuti in precedenza all'interno del laboratorio (nell'anno che ha preceduto il presente studio: 1,43 mg/L; 1,66 mg/L; 1,05 mg/L; 1,46 mg/L; 1,67 mg/L) indicando che la sensibilità degli organismi utilizzati ha un grado di variabilità contenuto e che comunque rimane all'interno dell'intervallo considerato accettabile.

In seguito è stato svolto un test cronico per definire il regime alimentare idoneo allo sviluppo esclusivo di organismi di sesso femminile. Il regime selezionato è stato quello che prevedeva per ogni singola *Daphnia* una dose tale da ottenere, nei beacker usati per l'esposizione, una concentrazione di alghe pari a  $0,937 \cdot 10^8$  cell/L e di lievito pari 60 mg/L somministrata tutti i giorni, per i primi tre giorni. Dal quarto giorno la dose è stata tale da ottenere una concentrazione di alghe pari a  $2,5 \cdot 10^8$  cell/L e di lievito pari a 160 mg/L, somministrata tutti i lunedì, mercoledì, venerdì. Infatti, questo tipo di regime non aveva dato alcun organismo di sesso maschile. Durante l'applicazione del regime ai test però ci possono essere delle eccezioni, infatti periodicamente può accadere che via sia la comparsa di qualche maschio, per cause ignote. Quando ciò avviene si interrompe l'esperimento in corso e si procede con un nuovo test. Inoltre il regime stabilito prevede una dose che non si allontana in modo eccessivo dalle dosi successive e garantisce il numero minimo di 60 nati per femmina come richiesto da ISO 10706 (ISO, 2000) e OECD 211 (OECD, 2008). Infine le alghe e il lievito somministrati forniscono una dose di carbonio pari a 0,123 mg/individuo/giorno che appartiene all'intervallo stabilito dall'OECD 211 (OECD, 2008) di 0,1 – 0,2 mg/L.

Nel complesso, questi esperimenti preliminari hanno indicato che il ceppo di *D. magna* utilizzato e le condizioni adottate per l'allevamento e per l'esecuzione dei test sono idonee a garantire risultati attendibili negli esperimenti sull'effetto dell'esposizione ai farmaci condotti successivamente.

La seconda fase sperimentale prevedeva test cronici con i singoli farmaci, propranololo e fluoxetina, con lo scopo di individuare per ognuno l'EC50, valore di concentrazione dove la riproduzione di *D. magna* è ridotta del 50% rispetto al trattamento di controllo. Questa informazione è stata utilizzata come base per il calcolo della concentrazione delle miscele, in termini di unità tossiche.

Sono stati effettuati e ritenuti validi due test cronici con il propranololo che insieme ai test successivi effettuati sulle miscele, che comprendono anche trattamenti con i singoli farmaci, forniscono un range di EC50 di 0,59 – 0,98 mg/L. Il range di concentrazioni di propranololo applicate nei test va da 0,25 mg/L a 2,00 mg/L, e i dati sperimentali mostravano che all'aumentare della concentrazione della sostanza si aveva una diminuzione della riproduzione. Test cronici (7 giorni) effettuati su *Ceriodaphnia dubia*, appartenente alla stessa famiglia di *Daphnia*, mostrano anche essi una diminuzione della riproduzione applicando un range di concentrazioni da 0 mg/L a 1 mg/L con un NOEC (No-Observed Effect Concentration) di 0,125 mg/L e un LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) di 0,250 mg/L (Huggett et al., 2002). Stanley et al. (2006) effettuando test cronici (21 giorni) su *D. magna* notano un aumento della riproduzione alle concentrazioni di 0,05 mg/L e 0,20 mg/L utilizzando l'R-propranololo, però queste concentrazioni non sono state saggiate nel presente studio, infatti il valore minore utilizzato è di 0,25 mg/L. Per cui l'informazione riportata in letteratura non siamo in grado né di confermarla né di smentirla. Altri studi riportano anche una diminuzione del battito cardiaco a 0,055 mg/L (LOEC) (Dzialowsky et al., 2006). Invece i test acuti eseguiti su *D. magna* in letteratura riportano un EC50 (48 h) di 2,75 mg/L (Ferrari et al., 2004), e EC50 (24 h) di 2,5 mg/L (Lilius et al., 1995).

Le concentrazioni ambientali di propranololo riportate in letteratura hanno range di concentrazioni di  $10^{-5}$  –  $5,9 \cdot 10^{-4}$  mg/L (0,01 mg/L nei pressi degli ospedali) questi valori sono molto lontani dal range di valori testati in questo lavoro (0,25 – 2 mg/L). Comunque in letteratura sono riportati test che espongono gli organismi allo stesso range di concentrazioni riscontrate in ambiente. L'esposizione di *Mytilus edulis trossulus* a range di 1 – 10000 µg/L, con differenti periodi di esposizione dipendenti dagli endpoint biologici valutati, determina una diminuzione della possibilità di crescita e della forza e dell'abbondanza dei filamenti del bisso. Anche i vertebrati come *Pimephales promelas* sono stati esposti a concentrazioni di propranololo con un range di 0,001 – 1/10 mg/L (21 giorni)

che determinano, ad esempio, una riduzione della produzione delle uova e della loro schiusa, ma anche un significativo bioaccumulo di propranololo nel plasma. Anche *Oncorhynchus mykiss* esposto a 0,0001 – 10 mg/L (40 giorni) presenta come effetti l'alterazione dei parametri relativi alla crescita e un significativo bioaccumulo del farmaco nel plasma del pesce (Owen et al., 2009).

Gli effetti della presenza del propranololo, come già affermato in precedenza, sono la riduzione del battito cardiaco, della riproduzione e della respirazione, ma il meccanismo attraverso il quale ciò si esplica non è riportato in letteratura. Le informazioni fisiologiche su *Daphnia* sono scarse, per cui non è chiaro in che modo questi effetti siano legati alla presenza del propranololo. Studi sugli invertebrati in vivo affermano che esso agisce sui recettori adrenergici diminuendo i livelli intracellulari di cAMP (adenosina monofosfato ciclico) (Franzellitti et al., 2011) che è un importante “secondo messaggero” coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale. La via metabolica del cAMP significativamente interessata dal propranololo è coinvolta in una varietà di funzioni fisiologiche nei molluschi, infatti, ad esempio, modula la disponibilità di energia per lo sviluppo delle gonadi risultando quindi fondamentale per la riproduzione di mitili (Fabbri e Capuzzo, 2010). Però il propranololo agisce anche come antagonista su un particolare tipo di recettore della serotonina (5-HT<sub>1</sub>), ma in *Daphnia* è confermata solo la presenza di alcuni tipi di recettori della serotonina con sicurezza e sembra che fra questi vi sia l'omologo del 5-HT<sub>1</sub>. Infine influenza anche la concentrazione di noradrenalina, con un effetto inibitorio sul trasportatore della noradrenalina.

Il secondo farmaco testato è stato la fluoxetina con la quale sono stati effettuati e ritenuti validi due esperimenti e che forniscono, insieme ai test delle miscele, un range di EC50 di 0,23 – 0,25 mg/L. Essi risultano minori rispetto al range di EC50 calcolato per il propranololo per cui la fluoxetina è ritenuta più tossica in quanto è sufficiente una concentrazione minore di fluoxetina, rispetto al propranololo, per avere un effetto nel 50 % degli individui. Le concentrazioni sottoposte a *Daphnia* avevano un range di 0,03 mg/L a 0,80 mg/L nella quale a 0,03 mg/L, soprattutto per il primo test, si ha un aumento della riproduzione che nei due test effettuati non risulta significativo rispetto al controllo mentre, in generale, all'aumentare della concentrazione di fluoxetina si ha una diminuzione del numero di nati per organismo. L'aumento del numero di nati rispetto al controllo è stato documentato

come significativo da Flaherty et al. (2005) a un valore di 0,036 mg/L (30 giorni), ma anche da Fong et al., (1998) che riporta la stessa concentrazione nell'affermare che la fluoxetina induce la deposizione delle uova nei mitili. Lo stesso fenomeno si è verificato anche in *Ceriodaphnia dubia* dove vi è stata una produzione maggiore di prole a 0,056 mg/L (Brooks et al., 2003b). Un aumento della riproduzione in *Daphnia* in seguito all'esposizione alla fluoxetina può essere un esempio del fenomeno chiamato "overcompensation hormesis", una risposta adattativa ai bassi livelli di stress che determina un miglioramento della fitness per un periodo limitato (Calabrese and Baldwin, 2002).

Test cronici (21 giorni) sulla riproduzione di *D. magna* riportati in letteratura presentano un NOEC di 0,174 e LOEC di 0,430 mg/L. (Stanley et al., 2007), quest'ultimo risulta più alto dell'EC50 riportato in questo studio. Per quanto riguarda i test acuti, Brooks et al. (2003a) riportano un LC50 (48 h) per *D. magna* di 0,820 mg/L.

Le concentrazioni ambientali di fluoxetina riportate in letteratura hanno un range di  $5,5 \cdot 10^{-6}$  –  $5,4 \cdot 10^{-4}$  mg/L e, come per il propranololo, sono molto lontane dalle concentrazioni testate (0,03 – 0,80 mg/L). Test effettuati nei laboratori dell'Università degli Studi di Bologna su *Mytilus galloprovincialis* esposto ad un range di concentrazioni di fluoxetina di 0,03 - 300 ng/L (7 giorni), quindi comprendendo anche concentrazioni ambientali, determinano alterazioni dello stato fisiologico degli organismi in particolare riguardo la stabilità delle membrane lisosomiali.

Secondo Campos et al. (2012) l'esposizione alla fluoxetina, determinando un aumento del neurotrasmettitore serotonina nello spazio sinaptico, porta ad un aumento della riproduzione legato anche alla concentrazione degli alimenti. Infatti basse concentrazioni degli alimenti in assenza della sostanza determinano la nascita di pochi individui, ma di dimensioni maggiori. Invece in presenza dell'SSRI si ha un aumento della concentrazione di serotonina e quindi una maggiore attività sinaptica in quanto il neurotrasmettitore interagisce maggiormente con i rispettivi recettori. Ciò determina un aumento del catabolismo aerobico e dei carboidrati, quest'ultimo legato ad aumento degli ormoni iperglicemici, portando ad una maggiore produzione di neonati ma riducendone le dimensioni, e la tolleranza a minori livelli di ossigeno. L'aumento della concentrazione di serotonina determina anche un diminuzione della concentrazione intracellulare di cAMP (Fazzino et al., 2009), proprio come il propranololo agendo sui recettori beta-adrenergici.

L'ultima fase sperimentale consisteva in un test cronico con una miscela dei due farmaci a percentuali e secondo unità tossiche totali di ogni miscela diverse. I dati sperimentali del test sono stati analizzati dal MixTox, un modello per la previsione degli effetti congiunti di una miscela, che ha permesso di stabilire quale fosse il modello che rappresentasse al meglio l'effetto della miscela.

L'applicazione del MixTox implica la scelta fra due modelli di riferimento: *concentration addition* (CA) e *independent action* (IA). Nel presente studio si è deciso di utilizzare il modello CA, anche se sono scarse le conoscenze sull'organismo e sulle modalità d'azione dei due farmaci. Questo perché in generale il CA, come modello di riferimento, sembra essere preferibile nella valutazione del rischio essendo il più conservativo in quanto la pendenza della curva (slope) concentrazione risposta è maggiore di 1,25 (Syberg et al., 2008). Inoltre, anche se i risultati dell'analisi non sono qui riportati in dettaglio, utilizzando come riferimento la IA, si arriva ad individuare lo stesso tipo di interazione tra le due sostanze, come quella più corrispondente ai dati sperimentali, cioè l'antagonismo *dose ratio dependent* (DR).

I dati riportati fino ad ora suggeriscono che, probabilmente, non vi saranno rischi ambientali effettivi in quanto è presente antagonismo tra i due farmaci, così l'effetto globale della miscela risulterà minore rispetto alla somma degli effetti dei singoli farmaci. Affermando ciò non bisogna dimenticare che i test effettuati non rispettano la realtà ambientale, infatti le miscele nell'ambiente acquatico non saranno mai costituite unicamente da due soli farmaci. Inoltre le concentrazioni ambientali rilevate sono sempre molto più basse rispetto a quelle testate, ma ciò non sminuisce l'importanza dei test effettuati poiché forniscono comunque nuove informazioni, anche semplicemente come punti di partenza per ulteriori approfondimenti.

L'effetto antagonista non può essere però generalizzato per tutti gli organismi, infatti studi sull'uomo hanno evidenziato effetti negativi per la somministrazione contemporanea di propranololo e fluoxetina. Infatti esistono casi in cui vi è stata bradicardia e sincope dovuta alla contemporanea assunzione dei due farmaci. L'ipotesi è che l'aggiunta di fluoxetina ad un paziente che assumeva già propranololo comporti il potenziamento dell'azione della serotonina compromettendo la conduzione atrio ventricolare o che comprometta la conduzione attraverso il nodo atrio ventricolare dove vi è la presenza dei recettori 5-HT.

Inoltre altri studi affermano che il metabolismo del lipofilico propranololo può essere inibito dalla fluoxetina (Drake et al., 1994). Quindi nell'uomo vi possono essere effetti sinergici a causa della contemporanea presenza dei due farmaci.

Nel modello scelto per il test effettuato, i parametri  $a$  e  $b$  sono entrambi maggiori di zero per cui si è in presenza di antagonismo più accentuato quando vi è una maggiore percentuale di propranololo rispetto alla fluoxetina. Il modello prevede comunque antagonismo in tutte le miscele, nel senso che l'inibizione della riproduzione, quando entrambe le sostanze sono presenti, è sempre minore, a parità di UT, rispetto a quando è presente una sola delle due sostanze. Risulta difficile formulare un'ipotesi che spieghi il meccanismo che porta a questo antagonismo date le scarse conoscenze disponibili sulle modalità d'azione dei due farmaci in *Daphnia*.

Si sa che il propranololo nell'uomo è antagonista dei recettori della serotonina del tipo 5-HT<sub>1</sub>, che possiedono i rispettivi omologhi in *Daphnia*. Un'ipotesi possibile postula la presenza in *Daphnia* di recettori con un comportamento simile ai recettori umani beta-adrenergici; la presenza di tali recettori non è dimostrata, ma *Daphnia* risponde in modo specifico all'adrenalina. Il propranololo occuperebbe il recettore per l'adrenalina, impedendo l'azione di quest'ultima e determinando di conseguenza un abbassamento della concentrazione di adenosina monofosfato ciclico (cAMP). Il propranololo occuperebbe anche i recettori 5-HT<sub>1</sub> per la serotonina, impedendone l'azione. Quest'ultima cosa impedirebbe l'abbassamento della concentrazione di cAMP normalmente determinato dalla serotonina, ma l'abbassamento si determinerebbe comunque, a causa del blocco dell'interazione tra adrenalina e i suoi recettori. La conseguenza dell'abbassamento della concentrazione di cAMP sarebbe una diminuzione della riproduzione.

Nel caso in cui fosse presente solo fluoxetina, il suo legame con la SERT porterebbe a un aumento della concentrazione di serotonina e quindi della sua interazione con i recettori 5-HT<sub>1</sub>, con conseguente abbassamento dei livelli di cAMP e quindi riduzione della riproduzione.

Entrambe le sostanze, da sole, determinerebbero quindi un abbassamento della concentrazione di cAMP e quindi una diminuzione della riproduzione, se pur attraverso meccanismi diversi.

Quando propranololo e fluoxetina sono entrambe presenti, l'aumento di concentrazione di serotonina determinato dalla fluoxetina provocherebbe una minor diminuzione della concentrazione di cAMP, rispetto a quello che si verifica in assenza di propranololo; questo perché i recettori 5-HT<sub>1</sub> sarebbero bloccati dal propranololo. In questo modo la fluoxetina perderebbe parte della sua efficacia nel ridurre la riproduzione. Chiaramente la riproduzione è influenzata da molte variabili e i farmaci possono avere più meccanismi d'azione diversi per i singoli organismi, per cui non siamo in grado di stabilire quali siano i meccanismi fisiologici che determinino effettivamente l'antagonismo tra i due farmaci, ma solo ipotizzare l'elemento d'azione comune, cioè l'interferenza nell'interazione tra la serotonina e il suo recettore.

Infine la riduzione dell'effetto risulta più accentuata dove vi è una maggior percentuale di propranololo. In particolare la curva 1 UT (figura 4.12) è asimmetrica e il suo massimo è tra il 60% e il 70% di propranololo. Queste percentuali di propranololo implicano necessariamente basse concentrazioni di fluoxetina vicine a 0,03 mg/L, concentrazione per cui Flaherty et al. (2005) indicano ormesi per la fluoxetina. Questo potrebbe spiegare l'ulteriore incremento della riproduzione rispetto a quello previsto dall'antagonismo semplice e determinare la *dose ratio dependence* (DR).

## 6. CONCLUSIONE

L'esposizione di *D. magna* alla miscela di propranololo e fluoxetina per 21 giorni ha evidenziato una interazione di tipo antagonista, più accentuato in presenza di maggiori percentuali (60 % - 70%) di propranololo rispetto alla fluoxetina. Le concentrazioni utilizzate di propranololo (0,25 - 2,00 mg/L) e di fluoxetina (0,03 - 0,80 mg/L) sono molto più elevate delle reali concentrazioni rilevate in ambiente. Gli effetti per il propranololo iniziano a essere evidenti alla concentrazione di 0,25 mg/L, mentre la fluoxetina presenta una riduzione delle nascite a partire da 0,05/0,10 mg/L e un aumento alla concentrazione di 0,03 mg/L, che non è statisticamente significativo, ma è in accordo con i risultati di studi precedenti che hanno individuato ormesi a concentrazioni simili.

Contrariamente a quanto avvenuto per altre specie, in particolare per effetti a livelli cellulari e sub-cellulari, non è comunque stato evidenziato alcun effetto sulla riproduzione a concentrazioni paragonabili a quelle finora misurate nelle acque superficiali. Mentre non era possibile escludere a priori un sinergismo tra due sostanze che avrebbe potuto determinare effetti a concentrazioni più basse, come già evidenziato, si è al contrario verificato antagonismo.

Purtroppo le informazioni sui meccanismi d'azione e sulla fisiologia di *D. magna* risultano scarse per cui risulta difficile capire quale sia effettivamente il meccanismo che determina questo antagonismo. Sicuramente i risultati riportano conferme sugli studi precedenti, e soprattutto informazioni da utilizzare nelle valutazioni del rischio ambientale nell'ambiente acquatico.

Gli studi futuri dovrebbero approfondire la fisiologia delle specie test utilizzate secondo i protocolli standard, ma anche valutare quali siano i meccanismi d'azione dei farmaci utilizzati per poter applicare al meglio l'approccio MixTox ed interpretarne i risultati.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Alexander B.S., Wood M.D., 1987. Stereoselective blockade of central [3H]5-hydroxytryptamine binding to multiple sites (5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT1C) by mianserin and propranolol. *J Pharm Pharmacol* 39:664–666.
- Anastas P.T., Warner J.C., 1998. *Green Chemistry. Theory and Practice*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Andreozzi R., Marotta R., Nicklas P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50, 1319-1330.
- Azmitia E.C., 1999. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 21 (Suppl. 1), 33S\_ 45.
- Ayali A., Harris-Warrick R.M., 1999. Monoamine control of the pacemaker kernel and cycle frequency in the lobster pyloric network. *J Neurosci.* 19:6712-6722.
- Barthe J.Y., Bevingut M., Clarac F., 1993. In vitro, proctolin and serotonin induced modulations of the abdominal motor system activities in crayfish. *Brain Res* 623:101-109.
- Baumann P., Zullino D.F., Eap C.B., 2002. Enantiomers' potential in psychopharmacology—a critical analysis with special emphasis on the antidepressant escitalopram. *Eur. Neuropsychopharm.* 12, 433–444.
- Belfroid A. C., Van der Horst A., Vethaak A.D., Schafer A.J., Rijis G.B.J., Wegener J., Confino,W.P., 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in the Netherlands. *Sci. Total Environ*, 225, 109-118.
- Boxall A.B.A, 2004. The environmental side effects of medication. *EMBO reports* VOL 5, NO 12.
- Braga O., Smythe G.A., Schafer A., Feitz A.J., 2005. Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.*, 39 3351-3358.
- Brodfuehrer P.D., Debski E.A., O’Gara B.A., Friesen W.O., 1995. Neuronal control of leech swimming. *J. Neurobiol.* 27, 403–418.
- Brooks B.W., Foran C.M., Richards S.M., Weston J.J., Turner P.K., Stanley J.K., Solomon K.R., Slattery M., La Point T.W., 2003a. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol Lett* 142:169–183.
- Brooks B.W., Dzialowski E.M., Turner P.K., Stanley J.K., Glidewell E.A., 2003b. Pharmaceutical effects on freshwater invertebrates. Annual Meeting of the American Society of Limnology and Oceanography, Salt Lake City,UT.
- Brooks B.W., Chambliss C.K., Stanley J.K., Ramirez A., Banks K.E., Johnson R.D., Lewis R.J., 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 464–469.
- Buikema A.L. Jr., Lee D.R., Cairns J., Jr.,1976. A screening bioassay using *Daphnia pulex* for refinery wastes discharged into freshwater. *J Test Eval.* 4:119–125
- Buser H.R., Poiger T., Müller M.D., 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.* 32 (22), 3449–3456.
- Calabrese E.J., Baldwin L.A., 2002. Defining hormesis. *Humax Exp. Toxicol.* 21, 91-97.

- Campos B., Piña B., Barata C., 2012. Environ. Sci. Technol. 2012, 46, 2943–2950.
- Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompart M., Garcia-Jares C., Rodriguez I., Gomez M., Ternes T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. Water Res. 38 (12), 2918–2926.
- Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., Pomati F., Calamari D., Zuccato E., 2006. Removal of pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. Environ. Sci. Technol, 40, 357-363.
- Castiglioni S., Zuccato E., Chiabrando C., Fanelli R., Bagnati R., 2008. Mass spectrometric analysis of illicit drugs in wastewater and surface water. Mass. Spectrom. Rev. 27, 378–394.
- Clark M.C., Dever T.E., Dever J.J., Xu P., Rehder V., Sosa M.A., Baro D.J., 2004. Arthropod 5-HT<sub>2</sub> receptors: a neurohormonal receptor in decapod crustaceans that displays agonist independent activity resulting from an evolutionary alteration to the DRY motif. J Neurosci 24:3421-3435.
- Daughton C.G., 2004. PPCPs in the environment: future research – beginning with the end always in mind. In: Kümmeler, K. (Ed.), Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks, second ed. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 463–495.
- Drake W. M., Gordon G.D., 1994. Heart block in a patient on propranolol and fluoxetine. The Lancet, 343, 8894; ProQuest Central. pg. 425.
- Dzialowski E.M., Turner P.K., Brooks B.W., 2006. Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in *Daphnia magna*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 50, 503–510.
- Ebert D., 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*.
- ENDS, 2005. Report, E. Chasing environmental risk assessment for pharmaceuticals. ENDS Report, 365, pp. 29–32, www.endsreport.com.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CHMP. GUIDELINE ON THE ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE, 2006. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00 corr 1\*
- Fabbri, E., Capuzzo, A., 2010. Cyclic AMP signaling in bivalve molluscs: an overview. J. Exp. Zool. A 313, 179–200.
- Fazzino F., Urbina M., Cedeno N., Lima L., 2009. Fluoxetine treatment to rats modifies serotonin transporter and cAMP in lymphocytes, CD4+ and CD8+ subpopulations and interleukins 2 and 4. International Immunopharmacology, 9 (4): 463-467.
- Fent K., Weston A.A., Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquat. Toxicol. 76, 122-159.
- Ferrari B., Mons R., Vollat B., Frayssé B., Paxeus N., Lo Giudice R., Pollio A., Garric J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? Environ. Toxicol. Chem. 23, 1344–1354.
- Florey E., Rathmayer M., 1978. The effects of octopamine and other amines on the heart and on neuromuscular transmission in decapod crustaceans: further evidence for a role as neurohormone. Comp. Biochem. Physiol. C 61C:229-237.
- Flaherty C.M., Kashian D.R., Dodson S.I., 2001. Ecological impacts of pharmaceuticals on zooplankton: the effects of three medication on *Daphnia magna*. Annual meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Baltimore, MD.

- Fong P.P., 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentration of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol. Bull.* 194 (2), 143-149.
- Franzellitti S, Buratti S, Valbonesi P, Capuzzo A, Fabbri E, 2011. The  $\beta$ -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat.Tosicol.* 101, 299-308.
- Gerhardt C.C., van Heerikhuizen H., 1997. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 334:1-23.
- Golet E.M., Alder A.C., Hartmann A., Ternes T.A., Giger W, 2001. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chem.* 73, 3632-3638.
- Goossens H., Ferech M., Coenen S., Stephens, P., 2007. European surveillance of antimicrobial consumption project group. Comparison of outpatient systemic antibacterial use in 2004 in the United States and 27 European countries. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1091–1095.
- Gorbi G., 1987. Utilizzazione di *Daphnia magna* in tossicologia ambientale. Atti del corso di formazione: utilizzazione di *Daphnia magna* in tossicologia ambientale. Reggio Emilia.
- Götz K., Keil F., 2007. Medikamentenentsorgung in privaten Haushalten: Ein Faktor bei der Gewässerbelastung mit Arzneimittelwirkstoffen? *UWSF-Z. Umweltchem. Okotox* 18, 180–188.
- Heather L.M., Svendsen C., Lister L.J., Gomez-Eyles J.L. and Spurgeon D.J., 2009. Measurement and modeling of the toxicity of binary mixtures in the nematode *Caenorhabditis elegans*- A test of independent action. *Environ. Toxic. and Chem.*, Vol. 28, No 1, pp 97-104.
- Heberer T., Stan H.J., 1996. Occurrence of polar organic contaminants in Berlin drinking water. *Vom Wasser* 86, 19–31.
- Heberer T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceuticals residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett*, 131: 5-17.
- Hernandez-Rauda R., Rozas G., Rozas G., Rey P., Otero J., Aldegunde M., 1999. Changes in the pituitary metabolism of monoamines (dopamine, norepinephrine, and serotonin) in female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during gonadal recrudescence. *Physiol. Biochem. Zool.* 72, 352\_ 359.
- Hiemke C., Härtter S., 2000. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 85, 11-28.
- Hilton M.J., Thomas K.V., 2003. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1015, 129–141.
- Hindberg I., Naesh O., 1992. Serotonin concentrations in plasma and variations during the menstrual cycle. *Clin. Chem.* 38, 2087\_ 2089
- Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environments. *Sci. Total Environ.*, 225, 109-108.
- Holm J.V., Rugge K., Bjerg P.L., Christensen T.H., 1995. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic-compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark) *Environ. Sci. Technol.* 29 (5), 1415–1420.

- Huggett D.B., Brooks B.W., Peterson B., Foran C.M., Schlenk, D., 2002. Toxicity of selected beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43 (2), 229–235.
- Huggett D.B., Khan I.A., Foran C.M., Schlenk D., 2003. Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluents. *Environ. Pollut.*, 121, 199-205.
- Huschek G., Hansen P.D., Maurer H.H., Kregel D., Kayser A., 2004. Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations. *Environ. Toxicol.* 19 (3), 226–240.
- IRSA, Istituto di Ricerca sulle Acque, 1999. Metodi ecotossicologici (sez. 8000), manuale dei Metodi analitici per le acque.
- ISO (International Organization for Standardization), 6341:1996. Water quality-Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea), Acute toxicity test.
- ISO 10706:2000. Water quality-Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea).
- Johnson A.C., Sumpter J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ. Sci. Technol.*, 35 (24), 4697-4703.
- Jones O.A., Voulvoulis N., Lester J.N., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res.* 36 (20), 5013–5022.
- Jonker M.J., Svendsen C., Bedaux J.J.M., Bongers M., Kammenga J.E. 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture doseresponse analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24:2701–2713.
- Jorgensen SE, Halling-Sorensen B, 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere Vol.* 40 (7), 691-699.
- Joss A., Siegrist H., Ternes T.A., 2008. Are we about to upgrade wastewater treatment for removing organic micropollutants? *Water Sci. Technol.* 57, 251–255.
- Khan S.J., Ongerth J.E., 2004. Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere* 54 (3), 355–367.
- Koch S., Perry K.W., Nelson D.L., Conway R.G., Threlkeld P.G., and Bymaster F.P, 2002. R-fluoxetine Increases Extracellular DA, NE, As Well As 5-HT in Rat Prefrontal Cortex and Hypothalamus: An in vivo Microdialysis and Receptor Binding Study. *Neuropsychopharmacology* 2002 – vol. 27, no. 6.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36 (6), 1202–1211.
- Kroeze W.K., Kristiansen K., Roth B.L., 2002. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr. Top Med. Chem.* 2:507-528.
- Kümmerer, K., 2007. Sustainable from the very beginning: rational design of molecules by life cycle engineering as an important approach for Green Pharmacy and Green Chemistry. *Green. Chem.* 9, 899–907.
- Kümmerer K., 2008. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and risk.* 3<sup>nd</sup> ed. Berlin, Germany: Springer; 26 p.

- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the environment – a review – Part II. *Chemosphere* 75 (4), 435–441.
- Kuspis D.A. and Krenzelok E.P., 1996. What happens to expired medication? A survey of community medication disposal. *Vet. Human Toxicol.*, 38, 48-9.
- Längin A., Schuster A., Kümmerer K., 2008. Chemicals in the environment – the need for a clear nomenclature: parent compounds, metabolites, transformation products and their elimination. *Clean* 36, 349–350.
- Lilius H., Hästbacka T., Isomaa B., 1995. A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14:2085-2088.
- Livingstone M.S., Harris-Warrick R.M., Kravitz E.A., 1980. Serotonin and octopamine produce opposite postures in lobsters. *Science* 208:76-79.
- Loewe S., Muischnek, H., 1926. Über Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung, Hilfsmittel der Fragestellung. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313–326.
- Loureiro S., Svendsen C., Ferreira A.G., Pinheiro C., Ribeiro F., Soarest A., 2010. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviation from conceptual models. *Environ. Toxic. and Chem.*, Vol. 29, No 8, pp. 1716-1726.
- Martin H., Svendsen C., Lister L.J., Gomez-Eyles J.L. and Spurgeon D.J., 2009. Measurement and modeling of the toxicity of binary mixtures in the nematode *Caenorhabditis elegans*—a test of independent action environmental toxicology and chemistry, vol. 28, no. 1, pp. 97–104.
- Metcalfe C.D., Koenig B.G., Bennie D.T., Servos M., Ternes T.A., Hirsch R., 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22 (12), 2872-2880.
- Minagh E., Hernan R., O'Rourke K., Lyng F.M., Davoren M., 2009. Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72:434–440
- Narvaez J. F. and Jimenez C., 2012. Pharmaceuticals products in the environment: sources, effects and risk. *Vitae*, volume 19 (1) 93-108.
- Nation J.L., 2002. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- NORMAN, Network of reference laboratories, research centres and related organization for monitoring of emerging environmental substances (<http://www.norman-network.net>).
- Norwegian Scientific Committee for Food Safety (Vitenskapskomiteen for mattrygghet), 2008. Combined toxic effects of multiple chemical exposures (Rapport 1).
- O'Brien E., Dietrich DR., 2004. Hindsight rather than foresight: reality versus the EU draft guideline on pharmaceuticals in the environment. *Trends Biotechnol.*, 22:36-30.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 202, *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test , 2004.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 211, *Daphnia magna* Reproduction Test, 2008.
- Owen S.F., Huggett D.B., Hutchinson T.H., Hetheridge M.J., Kinter L.B., Ericson J.F., Sumpter J.P., 2009. Uptake of propranolol, a cardiovascular pharmaceutical, from

- water into fish plasma and its effects on growth and organ biometry. *Aquat. Toxicol.* 93, 217–224.
- Peters R.H. and De Bernardi R., 1987. *Daphnia*. Memorie dell'istituto italiano di idrobiologia Dott. Marco De Marchi, volume 45.
  - Plackett R.L. and Hewlett P.S. (1952.) Quantal responses to mixtures of poisons. *J. Royal Stat. Soc. B.* 14: 141-163.
  - Pomati F., Orlandi C., Clerici M., Luciani F., Zuccato E., 2007. Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicol. Sci.* 102, 129–137.
  - Putschew A., Miehe U., Tellez A.S., Jekel M., 2007. Ozonation and reductive deiodination of iopromide to reduce the environmental burden of iodinated X-ray contrast media. *Water Sci. Technol.* 56, 159–165.
  - Ram J.L., Crawford G.W., Walker J.U., Mojares J.J., Patel N., Fong P.P., Kyojuka K., 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *J. Exp. Zool.* 265, 587–598.
  - Ruppert E.E., Barnes R.D., Fox R.S., 2004. *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach*, 7<sup>TH</sup> edition.
  - Santos L.H., Araújo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175(1-3), 45-95
  - Schuster A., Hädrich, C., Kümmerer, K., 2008. Flows of active pharmaceutical ingredients originating from health care practices on a local, regional, and nationwide level in Germany – is hospital effluent treatment an effective approach for risk reduction? *Water Air Soil Poll.* 8, 457–471.
  - Sosa M.A., Spitzer N., Edwards D.H., Baro D.J., 2004. A crustacean serotonin receptor: cloning and distribution in the thoracic ganglia of crayfish and freshwater prawn. *J Comp. Neurol.* 473:526-537.
  - Stackelberg P.E., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Henderson A.K., Reissman D.B., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Sci. Total Environ.* 329 (1–3), 99–113.
  - Stanley J.K., Ramirez A.J., Mottaleb M., Chambliss K., Brooks W.B., 2006. Enantiospecific toxicity of the  $\beta$ - blocker propranolol to *Daphnia magna* and *Pimephales Promelas*. *Environ. Toxicol. and Chem.*, Vol. 25, No 7, pp1780-1786.
  - Stanley J.K., Ramirez A.J., Chambliss C.K., Brooks B.W., 2007. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* 69 (2007) 9–16.
  - Stumpf M., Ternes T., Wilken R. D., Rodrigues S. V., Baumann W., 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.*, 225, 135-141.
  - SWITCH, Sustainable Water Management in the City of the Future, 2011. Training material Pharmaceutical compounds in environment Removal of pharmaceuticals from concentrated wastewater streams in source oriented sanitation ([www.switchtraining.eu](http://www.switchtraining.eu)).

- Syberg K., Elleby A., Pedersen H., Cedergreen N., Forbes V.E., 2008. Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*. *Ecotox. and Environ. Saf.* 69, 428-436.
- Ternes T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, 32, 3245-3260.
- Ternes T.A., Bonerz M., Schmidt T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 938 (1/2), 175–185.
- The Danish Veterinary and Food Administration, 2003. Combined Actions and Interactions of Chemicals in Mixtures. *The Toxicological Effects of Exposure to Mixtures of Industrial and Environmental Chemicals*.
- Thomas K.V., Hilton M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 49 (5/6), 436–444.
- Tierney, A.J., 2001. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comp. Biochem. Physiol. A* 128, 791–804.
- Tierney A.J., Mangiamele L.A., 2001. Effects of serotonin and serotonin analogs on posture and agonistic behavior in crayfish. *J Comp. Physiol. A* 187:757-767.
- Tierney A.J., Greenlaw M.A., Dams-O'Connor K., Aig S.D., Perna A.M., 2004. Behavioral effects of serotonin and serotonin agonists in two crayfish species, *Procambarus clarkii* and *Orconectes rusticus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139:495-502.
- Uhler G.C., Huminski P.T., Les F.T., Fong P.P., 2000. Cilia-driven rotational behavior in gastropod (*Physa elliptica*) embryos induced by serotonin and putative serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *J. Exp. Zool.* 286, 414–421.
- Vanderford B.J., Pearson R.A., Rexing D.J., Snyder S.A., 2003. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 6265–6274.
- Verbrugh H.A., Neeling de A.J.,(Eds.), 2003. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands. *SWAB NETHMAP 2003*.
- Weigel S., Kuhlmann J., Huhnerfuss H., 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibrac acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Sci. Total Environ.* 295 (1–3), 131–141.
- Weston J.J, Huggett D.B., Algood J.C., Foran C.M., Stattery M., 2001. Determination of fluoxetine (Prozac) and norfluoxetine in the aquatic environment. In: *Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Baltimore, MD.
- Yeh S.R., Musolf B.E., Edwards D.H., 1997. Neuronal adaptations to changes in the social dominance status of crayfish. *J Neurosci.* 17:697-708.
- Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet*; 355: 1789-90.
- Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R., et al., 2004. Risk related to the discharge of pharmaceuticals in the environment: further research is needed. In: *Pharmaceuticals in the environment. Second edition*. K Kummered Ed. Berlin, Springer-Verlag.
- Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R., Bagnati R., 2007. Inquinamento da farmaci: le evidenze (parte I). *Ricerca&Pratica* 23:67–73.